

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-37195
(P2000-37195A)

(43) 公開日 平成12年2月8日 (2000. 2. 8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
9/64		9/64	Z
# A 6 1 K 31/00	6 0 7	A 6 1 K 31/00	6 0 7 A
38/46		C 0 7 K 14/81	
C 0 7 K 14/81		A 6 1 K 37/54	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-209809
(62) 分割の表示 特願平2-505024の分割
(22) 出願日 平成2年3月1日 (1990. 3. 1)

(31) 優先権主張番号 3 1 9 2 1 2
(32) 優先日 平成1年3月6日 (1989. 3. 6)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 4 3 4 7 4 8
(32) 優先日 平成1年11月13日 (1989. 11. 13)
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 597055696
ザ・ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国テキサス州オースティン・ウエストセブンスストリート201
(72) 発明者 ジョセフ・エフ・サムブルツク
アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・アービンシモンズドライブ4320
(74) 代理人 100060782
弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子を提供すること。

【解決手段】 t-P Aのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-P A変異体であつて、296~302位置のアミノ酸が欠失しているt-P Aであるt-P A変異体及びそれをコードする遺伝子。

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-37195

(P2000-37195A)

(43) 公開日 平成12年2月8日 (2000.2.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
9/64		9/64	Z
// A 6 1 K 31/00	6 0 7	A 6 1 K 31/00	6 0 7 A
38/46		C 0 7 K 14/81	
C 0 7 K 14/81		A 6 1 K 37/54	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-209809
(62) 分割の表示	特願平2-505024の分割
(22) 出願日	平成2年3月1日 (1990.3.1)
(31) 優先権主張番号	3 1 9 2 1 2
(32) 優先日	平成1年3月6日 (1989.3.6)
(33) 優先権主張国	米国 (U S)
(31) 優先権主張番号	4 3 4 7 4 8
(32) 優先日	平成1年11月13日 (1989.11.13)
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

(71) 出願人	597055696
	ザ・ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム
	アメリカ合衆国テキサス州オースティン・ウエストセブンスストリート201
(72) 発明者	ジョセフ・エフ・サンプルツク
	アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・アービンシモンズドライブ4320
(74) 代理人	100060782
	弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子を提供すること。

【解決手段】 t-P Aのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-P A変異体であつて、296~302位置のアミノ酸が欠失しているt-P Aであるt-P A変異体及びそれをコードする遺伝子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体であって、296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAであるt-PA変異体。

【請求項2】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体であって、296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAであるt-PA変異体をコードしている遺伝子。

【請求項3】 (A) 296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAをコードしている遺伝子を含んで成るDNAにより質転染された宿主細胞を培養し、そして

(B) 生ずる変異体を単離することを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を得る方法。

【請求項4】 (A) 296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAを得、そして

(E) t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性の変異体をスクリーニングする、ことを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を提供する方法。

【請求項5】 t-PAの296～302位置のアミノ酸を欠失させることを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を得る方法。

【請求項6】 ATCC寄託番号7885を有し且に296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAをコードするpSVT7(R17) t-PA (Del 296-302) [DH-1]。

【請求項7】 296～302位置のアミノ酸が欠失しているt-PAをコードするプラズミドpSVT7(R17) t-PA (Del 296-302)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は同起源阻害剤による阻害に対して抵抗性であるキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ変異株、及びそれをコードする遺伝子に関する。本発明は又、本発明のセリン・プロテアーゼ変異株を阻害するセリン・プロテアーゼインヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子に関する。セリン・プロテアーゼ変異株、及びセリン・プロテアーゼインヒビター変異株は、例えば薬剤として有用である。

【0002】

【従来の技術】I. セリン・プロテアーゼ
セリン・プロテアーゼ(E. C. 3. 4. 21)は、β-チリ結合分裂における基質試薬としてセリンを使用するエント・シチダーゼのサブサブクラスである (Bar-

rett, A. J., 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁; 及びHartley, B. S., Ann Rev Biochem., 29: 45-72 (1960)。

【0003】セリン・プロテアーゼは文献により周知であり、セリン・プロテアーゼの2つのスーパーファミリー、すなわちキモトリプシン・スーパーファミリー、及びストリプティミセス・キモトリプシン・スーパーファミリーはこれまでに観察されていた (Barrett, A. J., 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986) , 及びJames, M. N. G., 於: Proteolysis and Physiological Regulation, 出版 Ribbons, D. W. 等, Academic Press, New York, 125-142頁 (1976))。

【0004】キモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼの例には組織型プラスミン・ゲン活性化因子(下文では"t-PA")、トリプシン、トリプシン様プロテアーゼ、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、ウロキナーゼ(又は尿型プラスミン・ゲン活性化因子(下文では"u-PA")、アクロニン、活性化プロテインC、C1エステラーゼ、カテプシンG、チマーゼ、ならびにカリクレイン、トロンビン及び因子VIIa, IXa, Xa, XIa及びXIIaを含む血液凝固カスケードのプロテアーゼが含まれる (Barrett, A. J., 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986) , Strassburger, W. 等, FERS Lett., 157: 219-223 (1983) ; Dayhoff, M. O., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5巻, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland (1972) ; 及びRosenberg, R. D. 等, Hosp. Pract., 21: 131-137 (1986))。 t-PA、プラスミン、u-PA、及び血液凝固カスケードのプロテアーゼを含むキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼのいくつかは巨大分子であり、セリン・プロテアーゼ触媒ドメインの他にその活性の調節に一部関与する構造ドメインを含む (Barrett, A. J., 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986) , Gerard, R. D. 等, Mol. Biol. Med., 3: 449-457 (1

986) ; 及び Blasi, F. 等, 於: Human Genes and Diseases, 出版 Blasi, F. 等, John Wiley & Sons, Ltd., 377-414頁 (1986) ;

【0005】キモトリプシン・スーパーファミリーのすべてのセリン・プロテアーゼの触媒ドメインは配列相同性、及び構造相同性の両方を有する。配列相同性は以下

(i) 特徴的活性化部位残基 (例えばトリプシンの場合 Ser₁₉₅, His₅₇, 及び Asp₁₀₂) ;

(ii) オキシアニオン・ホール (例えばトリプシンの場合 Gly₁₉₃, Asp₁₉₄) ; 及び

(iii) 構造中にβ-シート骨格を形成するシアン残基の全部の保持を含む (Harley, B. S., Symp. Soc. Gen. Microbiol., 24: 152-182 (1974)) ;

【0006】構造相同性は以下

(i) 2個のグリーク鍵構造から成る共通折りたたみ (Richardson, J., Adv. Prot. Chem., 34: 167-339 (1981)) ;

(ii) 触媒残基の共通の配置 ; 及び

(iii) 分子のコア中の構造の詳細な保持 (Stroud, R. M., Sci. Am., 231: 24-38 (1974)) を含む ;

【0007】キモトリプシン・スーパーファミリーのメンバーの配列を比較すると触媒ドメイン内のアミノ酸の挿入、又は欠失の存在が明らかになる (例えば図1を参照) ; すべての場合、これらの挿入又は欠失は折りたたまれた分子の表面にあり、従って分子の基本的構造に影響しない (Strassburger, W. 等, FEBS Lett., 157: 219-223 (1983)) ;

II. セリン・プロテアーゼ・インヒビター

セリン・プロテアーゼ・インヒビターは文献により周知であり、以下の科 (ファミリー) に分けられる : (i) 塩基性プロテアーゼ・インヒビターとして知られるヤセイ臓トリプシン・インヒビター (Kunitz) ファミリー (Ketcham, L. K. 等, 於: Atlas of Protein Sequence and Structure, 出版 Dayhoff, M. O., 131-143頁 (1978) (下文中は "BPTI") ; (ii) Kazal ファミリー ; (iii) ストレプトリセス・ゴブチリシン・インヒビターファミリー (下文中は "SSI") ; (iv) セルビリン・ファミリー ; (v) 大豆トリプシン・インヒビター (Kunitz) ファミリー ; (vi) ボサト・インヒビターファミリー ; 及び (vii) ボーファナー・ファミリー

(Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980) ; Read, R. J. 等, 於: Proteinase In-

hibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986) ; 及び Laskowski, M. 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52: 545-553 (1987)) ;

【0008】BPTI, Kazal, SSI, 大豆トリプシン、及びボサト・インヒビターファミリーのメンバーを含む多くの完全な形の阻害剤、及びセルビリン・ファミリー・ストレプトリプシンの分裂形に関して結晶学的データが得られる (Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986)) ; これらのセリン・プロテアーゼ・インヒビターは大きさ及び配列が異なるタンパク質であるにもかかわらず、これまでに研究された完全な形のインヒビターはすべて分子の表面から伸びる特徴的なループを共通して有しており、それは同起源のセリン・プロテアーゼの活性化部位に対する認識配列を含む (Levin, E. G. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 6804-6808 (1983)) ; 異なるセリン・プロテアーゼ・インヒビターのループが構造的に類似していることは驚くべきことである (Papamokos, E. 等, J. Mol. Biol., 158: 515-537 (1982)) ; 阻害剤のKazalファミリー及びストレプトリセス・ゴブチリシン・ファミリーはいくらか構造及び配列に類似性があるが、一般に異なるファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビターは活性化部位ループ以外に構造的関連性はない ;

【0009】セリン・プロテアーゼ・インヒビターの多くは広範囲の特異性を持ち、血液凝固セリン・プロテアーゼを含むプロテアーゼのキモトリプシン・スーパーファミリー、及びセリン・プロテアーゼのストレプトリセス・ゴブチリシン・スーパーファミリーの両方を阻害することができる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980)) ; 各阻害剤の特異性はセリン・プロテアーゼによる阻害剤の潜在分裂の部位への直接のアミノ末端であるアミノ酸の同定によりまず決定すると思われる ; P₁部位残基として知られるこのアミノ酸はセリン・プロテアーゼの活性部位内のセリンとアミル結合を形成すると思われる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980)) ;

【0010】A. BPTIファミリー

BPTIファミリーに属するセリン・プロテアーゼ・インヒビターには、BPTI、ハビ毒インヒビター、インターアルファ・インヒビター、及びA4アミロイド前駆体A4695が含まれる (Laskowski, M.

等, Ann. Rev. Biochem., 49:593-626 (1980); Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986); 及び Po-

nte, P. 等, Nature, 331:525-527 (1988)), セリン プロテアーゼ、及びそれらと同起源のBPTIファミリー阻害剤の例を下表Iに挙げる。

【0011】

表I

セリン プロテアーゼ	同起源BPTI阻害剤
トリプシン	BPTI
	ヘビ毒インヒビター
	インターアルファ インヒビター
(未知)	A4アミロイド前駆体A4695
	プロテアーゼ ネグリン II

B. Kazalファミリー

Kazalファミリーに属するセリン プロテアーゼインヒビターには、すい臓分泌阻害剤、オボムコイド、及び精漿アクトリン インヒビターが含まれる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49:593-626 (1980); Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Else-

vier, Amsterdam, 301-336頁 (1986); 及びLaskowski, M. 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., LII:545-553 (1987)), セリン プロテアーゼ、及びそれらと同起源のKazalファミリー阻害剤の例を下表IIに挙げる。

【0012】

表II

セリン プロテアーゼ	同起源Kazal阻害剤
トリプシン	すい臓分泌阻害剤
	オボムコイド
	精漿アクトリン インヒビター
アクトリン	オボムコイド
	精漿アクトリン インヒビター

C. ストレプトミセス アブチリシン インヒビター

ストレプトミセス アブチリシン インヒビターファミリーに属するセリンプロテアーゼ インヒビターには、ストレプトミセス アルボグリセオルスから得られる阻害剤、及びグラスミストレブチンが含まれる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem.

49:593-626 (1980))。セリンプロテアーゼ及びそれらと同起源のストレプトミセスアブチリシン クラスの阻害剤の例を下表IIIに挙げる。

【0013】

表III

セリン プロテアーゼ	同起源SSIインヒビター
アブチリシン (BPN')	ストレプトミセス アルボグリセオルス
	インヒビター
グラスミストレブチン	グラスミストレブチン
トリプシン	グラスミストレブチン

D. セルピンファミリー

セルピンファミリーに属するセリン プロテアーゼインヒビターには、プラスミンの活性化因子インヒビターPAI-1, PAI-2及びPAI-3, C1エステラーゼ インヒビター、アルファ₂-アンチプラスミン、コントログリン、アルファ₁-アンチトリプシン、アンチトロンビン III、プロテアーゼ ネグリン I、アルファ₁-アンチキモトリプシン、プロテオインCインヒビター、ヘパリン補因子 III、及び成長ホルモン調節タンパク質が含まれる (Carrel, R. W. 等, Cold Spring Harbor

Symp. Quant. Biol., 52:527-535 (1987); Sommer, J. 等, Biochem., 26:6407-6410 (1987); Suzuki, K. 等, J. Biol. Chem., 262:611-616 (1987); 及びStump, D. C. 等, J. Biol. Chem., 261:12759-12766 (1986))。

【0014】セルピンによるセリン プロテアーゼの阻害はTravis, J. 等, Ann. Rev. Biochem., 52:655-709 (1983); Carrel, R. W. 等, Trends Biochem. Sc

i, 10:20-24 (1985); Sprengers, E. D. 等, Blood, 69:381-387 (1987), 及び Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam (1986) で調査

されている。
【0015】セリン・プロテアーゼ、及びそれらと同起源のセルピン・インヒビターの例を下表IVに挙げる。
【0016】

表IV

セリン・プロテアーゼ 活性化プロテインC	同起源セルピン・インヒビター プロテアーゼ阻害剤 PAI-1
C1エステラーゼ カテプシンG	C1エステラーゼ・インヒビター アルファ-1-アンチトリプシン アルファ-1-アンチキモトリプシン アルファ-1-アンチキモトリプシン アルファ-1-アンチキモトリプシン アルファ-2-アンチトリプシン コントリプシン
凝固因子 (VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa) エラスターゼ カリクレイン	アンチトリプシン 111 C1エステラーゼ・インヒビター アルファ-1-アンチトリプシン C1エステラーゼ・インヒビター アルファ-1-アンチトリプシン アルファ-2-アンチトリプシン アンチトリプシン 111 ヘパリン補因子 11
トランスミン トロンヒン	PAI-1, PAI-2, PAI-3 アルファ-1-アンチトリプシン 成長因子調節蛋白質 プロテアーゼ・ネクシン 1 PAI-1, PAI-2, PAI-3
t-PA t-PA	ロテアーゼ・インヒビターには、じゃがいも、大麦、及びひるからの阻害剤が含まれる (Read, R. J. 等, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))。セリン・プロテアーゼ、及びそれらのポテト・インヒビターの例を下表Vに挙げる。 【0018】
トリプシン様・プロテアーゼ u-PA	表V ポテト・インヒビター 大麦キモトリプシン・インヒビター 大麦キモトリプシン・インヒビター 大麦キモトリプシン・カルスベルグ・ひる阻害剤・エグリン (1980) 1。セリン・プロテアーゼ、及びそれらのポーマン・パーク・インヒビターの例を下表VIに挙げる。 【0019】

E. 大豆トリプシン・インヒビター・ファミリー
大豆から精製した大豆トリプシン・インヒビター・ファミリーの唯一の例は配列が決定されている。牛すい臓トリプシンとのその複合体が研究されている (Sweet, R. M. 等, Biochem., 13:4214-4228 (1974))。
【0017】F. ポテト・インヒビター・ファミリー
ポテト・インヒビター・ファミリーに属するセリン・プ

ロテアーゼ・インヒビターには、じゃがいも、大麦、及びひるからの阻害剤が含まれる (Read, R. J. 等, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))。セリン・プロテアーゼ、及びそれらのポテト・インヒビターの例を下表Vに挙げる。
【0018】

表V

セリン・プロテアーゼ キモトリプシン スズキトリプシン・ポ スズキトリプシン・カルスベルグ	ポテト・インヒビター 大麦キモトリプシン・インヒビター 大麦キモトリプシン・インヒビター 大麦キモトリプシン・カルスベルグ・ひる阻害剤・エグリン
--	---

G. ポーマン・パーク・インヒビター
ポーマン・パーク・インヒビター・ファミリーに属するセリン・プロテアーゼ・インヒビターはマメからの相同タンパク質を含む (Laskowski, M. 等, An
n Rev. Biochem., 49:593-626

(1980) 1。セリン・プロテアーゼ、及びそれらのポーマン・パーク・インヒビターの例を下表VIに挙げる。
【0019】

表VI

セリン・プロテアーゼ
トリプシン
エラスターゼ
キモトリプシン

ボーマン・マーク・インヒビター
あおいまめ阻害剤 (I V)
ガーデンピーン阻害剤
アズキマメ阻害剤 (I I)

I I I. セリン・プロテアーゼ・インヒビター複合体
すべてのファミリーからのセリン・プロテアーゼ・イン
ヒビターはそれらと同起源のセリン・プロテアーゼと安
定な 1:1 複合体を形成する。これらの複合体の解離は
非常におそい(数時間から数日)(Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980)), 及び Levin, E. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 6804-6808 (1983))。セル
ピンを除くすべてのセリン・プロテアーゼ・インヒビタ
ーの場合、解離生成物は完全な阻害剤、及び分岐した阻害
剤分子の混合物である。他方、セリン・プロテアーゼ
セウビ・複合体は解離により分岐した阻害剤分子のみを
生ずるようなので、セルピンは他のセリン・プロテアー
ゼ・インヒビターと多岐異なる機構を使用すると思われ
る。

【0020】トリプシン-BPTI、キモトリプシン-
ボザムコイド・インヒビター、キモトリプシン-ドネト
・インヒビター、及びストリプミセマ・ブブチリン
・ストリプミセマ・ブブチリン・インヒビターを含
む数種のセリン・プロテアーゼ阻害剤複合体に関する
構造データが得られる(Read, R. J. 等, 監: Proteinase Inhibitors, 出版: B
arrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))。これ
らの構造を調べると、阻害剤の脂的な配列にも関わら
ず、各阻害剤とその同起源のセリン・プロテアーゼ間の
特異的な相互作用において顕著な類似性があることが明
らかになる。本発明においてこの構造的類似性により
結晶構造が得られない場合でも阻害剤及びそれと同起源
のセリン・プロテアーゼの間にかかる水素酸相互作用
を予測することができるということを示唆した。

【0021】上記の議論の通り阻害剤は活性中心を含
み、それがセリン・プロテアーゼの活性部位に対する拮
抗基質となる。活性中心の P_1-P_2 残基(例えば PAI
-1 の場合 ARG₃₄₆-Met₃₄₇)間の π - π 結合への
攻撃によりセリン・プロテアーゼからの生成物の正常
で迅速な解離が起こらず、おそらにプロテアーゼの活性
部位のセリン及び阻害剤の P_1 残基の間の共有結合の形
成により安定なセリン・プロテアーゼ・インヒビター複
合体が確立される(Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626
(1980))。この機構は、PAI-1などの阻害剤
の活性中心がセリン・プロテアーゼの活性部位に緊密
に、正確に適合しなければならないことを示す。しかしこ
れまで PAI-1、それと同起源のセリン・プロテアー

ゼ、t-PA、又は t-PA/PAI-1 複合体につい
ての X-線結晶学的データはない。従ってこのタンパク
質の対力間の相互作用の正確な性質は未知である。他の
セルピン、又はセルピン・セリン・プロテアーゼ複合体
の構造についての情報も同様に不足している。

I V. セリン・プロテアーゼの利用

キモトリプシン・ブーバ・ファミリーの特に重要なセリ
ン・プロテアーゼは t-PA である。t-PA は直接作
用して血栓(血餅)を溶解するわけではないが、心筋硬
塞、肺塞栓症、及び重症の静脈血栓の治療に、冠動脈内
又は静脈内投与によって現在使用されている。t-PA
はプラスミン・ゲルの Arg₆₆ 及び Val₆₆ 間の π - π
結合の分裂を促進し(Robbins, K. C.
等, J. Biol. Chem., 242: 2333-2
342 (1967))。それにより不活性化プロモ
を強力であるが非特異的なプロテアーゼ、プラスミンに
交換し、それが血餅のフィブリンの網目を分解する(B
achmann, F. 等, Semin. Thromb. H
aemostas., 43: 77-89 (1984))。Ger
ard, R. D. 等, Mol. Biol. Med., 3: 449-557 (1986))、及び Verstra
ete, M. 等, Blood, 67: 1529-154
1 (1986))。

【0022】t-PA は必ずしも全身的にフィブリン
ゲルを枯渇させることなく局所的なフィブリン溶解現象
を起こす。これは t-PA がフィブリンに直接結合して
フィブリン-t-PA 複合体を形成することができ、その
プラスミン・ゲルに対する親和力が約 500 倍に増加す
るからである(Ranjiv, M. 等, Biochem. Biophys. Acta, 704: 461-469
(1982))。及び Rijken, D. C. 等, J. Biol. Chem., 257: 2920-2925 (1
982))。このようにプラスミン・ゲルも高濃度で存
在する(Wiman, B. 等, Nature, 272: 549-550 (1978))。冠動脈血栓に、静脈内投
与された t-PA が結合すると血栓の部位でプラスミン
が有効に製造され、そこで最高に働く。

【0023】現在、t-PA は最初にボーマンの形で
投与され、その後一定の注力を受ける。3 時間の標準の
治療の間に投与される酵素の合計量は一般に約 50-1
00 mg である。2つの理由でこのような大量を必要と
することが明白である。第1に、肝細胞による循環から
の急速な t-PA のクリアランスの効果を補うため(K
rause, J., Fibrinolysis, 2: 133-142 (1988))、及び第2に、血漿及び血
小板中に存在する比較的高濃度のセリン・プロテアーゼ

インヒビターの影響を克服するため (Carrell, R. W. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁403-420 (1986))。

【0024】t-PAの主な生理学的阻害剤はセルピン、PAI-1、約50kdの糖タンパク質である (Pannekoek, H. 等, EMBO J., 5: 2539-2544 (1986); Ginsberg, D. 等, J. Clin. Invest., 78: 1673-1680 (1980); 及び Carrell, R. W. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁403-420 (1986))。PAI-1は心筋梗塞から生き残った人からの血漿のフィブリン溶解現象の能力が減少している原因とされてきた (Hamsten, A. 等, New Eng. J. Med., 313: 1557-1563 (1985))。さらにPAI-1は急性期反応性タンパク質であり、心筋梗塞に伴いその量が増加することにより、治療のためのt-PAの投与後に血漿中に残った実質的量のt-PAのフィブリン溶解現象活性を減衰させる (Lucore, C. L. 等, Circ., 77: 660-669 (1988))。PAI-1とt-PAの結合の2次速度定数は非常に高い (Hekman, C. 等, Arch. Biochem. Biophys., 262: 199-210 (1988))。人の血漿によるt-PAの最初の“急速相 (fast phase)”阻害を説明している (Colucci, M. 等, J. Lab. Clin. Med., 108: 53-59 (1986))。従ってインヒビターにおけるPAI-1によるt-PAの急速な中和は、急性心筋梗塞の治療をした10%から35%の患者が冒される合併症である、血栓溶解治療後の冠動脈閉塞に寄与する (Chesbro, J. H. 等, Circ., 76: 142-154 (1987))。

【0025】C1エステラーゼ・インヒビター、及びアルファ-2-アンチトリプシンなどの他のセルピンとt-PAの結合定数はPAI-1の場合より低次数である (Ranby, M. 等, Throm. Res., 27: 175-183 (1982); 及び Hekman, C. 等, Arch. Biochem. Biophys., 262: 199-210 (1988))。それにもかかわらずこれらのセルピンは注入されたt-PAと結合し、t-PAの有利な薬理学的性質を減衰させることができる。

【0026】t-PA及びPAI-1の他に多くのセリン・プロテアーゼ・セルピンの対が医学的に非常に重要である。例えばu-PAはt-PAと同様に心筋梗塞の治療に有用であり、t-PAと同様のセリン・プロテア

ーゼ・インヒビターによる阻害を受ける。

【0027】傷における血餅形成の促進に局所的に使用されるセリン・プロテアーゼであるトロンبینはプロ凝固剤である。それと同起源のセルピンである、アンチトロンبین-111は、トロンبین、及び因子IXa, Xa, XIa及びXIIaを含む血液凝固カスケードに関与する多くのセリン・プロテアーゼを特異的に阻害する凝固防止剤である (Heimburger, N. 等, 於: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, 出版 Fritz, H. 等, Walter de Gruyter, New York, 頁1-22 (1971); Kurachi, K. 等, Biochem., 15: 373-377 (1976); Kitachi, K. 等, Biochem., 16: 5831-5839 (1977); 及び Osterud, B. 等, Semin. Thromb. Haemost., 3: 295-305 (1976))。アンチトロンبین-111は播種性血管内血液凝固の治療に使用されてきた。トロンبینによりプロテインCを活性化すると、活性化プロテインCが凝固因子Va及びVIIIaを不活性化し、それ自身はそれと同起源のセルピン、プロテインCインヒビターにより阻害されるので血液凝固過程の自己制限が起こる。

【0028】子宮収縮を起こす、血管の浸透性を増す、及び血液凝固の内部経路を起こす機能を持つカリクレインは、比較的重要なセルピンのひとつであるアルファ-1-アンチトリプシンにより阻害を受ける。

【0029】アルファ-1-アンチトリプシンはトリプシンと同様に白血球エラスターゼ、及びサチプシンも阻害する (Heimburger, N. 等, 於: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, 出版 Fritz, H. 等, Walter de Gruyter, New York, 頁1-47 (1971); Janoff, A., Am. Rev. Resp. Dis., 105: 121-127 (1972); 及び Ohlsson, K. 等, Eur. J. Biochem., 36: 473-481 (1973))。アルファ-1-アンチトリプシンの遺伝子欠失は直接気腫に関連し (Carrell, R. W. 等, Trends

【0030】Biochem. Sci., 10: 20-24 (1985))。従ってアルファ-1-アンチトリプシン置換が気腫の治療に使用されてきた (Marx, J. L., Science, 243: 315-316 (1989))。

【0031】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的

は、キモトリプシン、スーパーファミリーの野生型セリン・プロテアーゼ、特に野生型トールPAをタンパク質工学により改良し、必ずしも他の有利な薬理学的性質を変えることなく、その酵素有効性を増し、及び、又は必要な投与量を変えることである。

【0032】本発明のもうひとつの目的は、キモトリプシン、スーパーファミリーの改良セリン・プロテアーゼをコードする遺伝子を提供することである。

【0033】本発明のさらに別の目的は、特にセリン・プロテアーゼの野生型セリン・プロテアーゼ・インヒビター、特に野生型PAI-1を変え、それらの阻害有効性を増し、及び、又はその投与必要量を変え、本発明の変異セリン・プロテアーゼを阻害することができるようになることである。

【0034】本発明のさらに別の目的は、改良セリン・プロテアーゼ・インヒビターをコードする遺伝子を提供することである。

【0035】本発明のこれらの、及び他の目的は、同起源の阻害剤による阻害に対して抵抗性であるキモトリプシン、スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・変異株、及びそれをコードする遺伝子；ならびにセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害するセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株；及びそれをコードする遺伝子により満たされ、これは下文に示す本発明の詳細な説明により明らかとなるであろう。

【0036】

【課題を解決するための手段】上記で議論した通り、本発明の上記の目的は、それらと同起源の阻害剤による阻害にたいして抵抗性を持つキモトリプシン、スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ変異株；及びそれをコードする遺伝子を用いたひとつの具体化により達成することができた。

【0037】本発明のもうひとつの具体化において、本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害するセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子により上記の目的を達成した。

【0038】さらに別の具体化において、本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株はキモトリプシン、スーパーファミリーの野生型セリン・プロテアーゼをも阻害する。

【0039】キモトリプシナーゼのセリン・プロテアーゼ・サブファミリーのメンバーはすべて相同タンパク質であり、共通の作用機構を有するので、本発明において使用するキモトリプシン、スーパーファミリーの特定のセリン・プロテアーゼはここで重要ではない。そのようなキモトリプシン、スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼの特別な例には上記で上げたセリン・プロテアーゼ、すなわちトールPA、トリプシン、トリプ-

シン様プロテアーゼ、キモトリプシン、パラフィン、エラスターゼ、トールPA、アクリン、活性化プロイン(C)、C1エステラーゼ、カニニンG、チマーゼ、及びカリクレイン、トリプシン、及び因子VIIa、IXa、Xa、XIa、ならびにXIaを含む血液凝固カスケードのプロテアーゼが含まれる。本発明において使用した好ましいキモトリプシン、スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼはトールPAである。

【0040】キモトリプシン、スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害にたいして抵抗性を示す特定のセリン・プロテアーゼ・インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなインヒビターの例にはBPTIファミリー、Kazalファミリー、SSIファミリー、セルピンファミリー、大豆トリプシンインヒビター(Kunitz)ファミリー、ザンティンインヒビターファミリー、及びボーマン・エー・ファミリーのメンバーが含まれる。

【0041】キモトリプシン、スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害にたいして抵抗性を示す特定のBPTIインヒビターは本発明において重要ではない。そのようなBPTIインヒビターの例にはBPTI-1、ハビ毒インヒビター、インターアルファインヒビター、及びA4アミロイド前駆体A4695が含まれる。

【0042】キモトリプシン、スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害にたいして抵抗性を示す特定のKazalインヒビターは本発明において重要ではない。そのようなKazalインヒビターの例にはすい臓分泌インヒビター、サボムコイド、及び精漿アクリンインヒビターが含まれる。

【0043】キモトリプシン、スーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害にたいして抵抗性を示す特定のセルピン・インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなセルピン・インヒビターの例にはPAI-1、PAI-2、PAI-3、C1エステラーゼ・インヒビター(C1inh)、プロテインC・インヒビター(PCinh)、ヘパリン、補因子-11(HC11)、アルファ-1-アンチフィブラミン(A2AP)、アンチトリプシン-11(AT11)、アルファ-1-アンチトリプシン-A1AT1、プロテアーゼ・ネクシン-1(Nex-1)、コントラプシン(Contrps)、成長ホルモン調節タンパク質(GHRP)、及びアルファ-1-アンチキモトリプシン(ACHym)が含まれる。キモトリプシンファミリーのセリン・プロテアーゼが阻害にたいして抵抗性を示す好ましいセルピンはPAI-1である。

【0044】本発明のキモトリプシン、スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害することができる変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターをそれから誘導すること

ができる特定のセリン・プロテアーゼ・インヒビターは、本発明において重要ではない。そのようなセリン・プロテアーゼ・インヒビターの例にはBPTI、Kazal、SSI、Kunitz、バネト・インヒビター、スーパー・カーク・インヒビター、及びセリン・プロテアーゼのメンバーが含まれ、PAI-1、PAI-2、PAI-3、O1エステラーゼ・インヒビター、プロテオグリーク・インヒビター、ペロリン・補因子-11、アルファ-2-アンチトリプシン、アンチトロン、ビン・III、アルファ-1-アンチトリプシン、プロテアーゼ・インヒビター-1、コレステラジン、成長ホルモン調節タンパク質、及びアルファ-1-アンチトリプシンなどのセリン・プロテアーゼのセリン・プロテアーゼ・インヒビターが好ましい。キモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター・抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害する好ましい変異セリンはPAI-1である。

【0045】すべての周知のセリン・プロテアーゼ・インヒビターはその活性中心ループにおいて構造的に相同であり、それらと同起源のセリン・プロテアーゼと類似の相互作用を行う(Read, R. J. 等, 於 Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁301-336 (1986))。セリン・プロテアーゼ、及びセリン・プロテアーゼ・インヒビター間の構造における対応はこれまでに研究されたことのない複合体のモデルの構築に利用することかできる。

【0046】t-PA、及び他のセリン・プロテアーゼの触媒ドメインの間の構造的相同性が高いので(Blundell, T. 等, Nature, 326:347-352 (1987))、本発明においてトリプシン、及びBPTI間の複合体の周知の構造(Huber, R. 等, J. Mol. Biol., 89:73-101 (1974)) ; 及びBode, W. 等, 於 Proteolysis and Physiological Regulation, Academic Press, New York, 頁43-76 (1976))、従ってPAI-1のE₃₅₀はt-PAのR₃₀₄とイオン対を形成すると思われる。

【0047】アミノ酸残基₂₁₄SWGS₂₁₇の周辺の領域はキモトリプシン・スーパーファミリーのすべてのメンバーの間に高度に保持されている。反対にアミノ酸残基₄₁NSGYHF₄₁の周囲の領域は比較的变化し易く、インヒビターと相互作用をける表面の部分形成する。図1に示される通りこの領域のt-PAのアミノ酸配列は2つの大きな点でトリプシンのアミノ酸配列と異なる。第1にトリプシンのTyr (Y₃₉) 残基がt-PAにおいてはArg (R₃₀₄) で置換されている。t-PA及びPAI-1の間の相互作用がトリプシン及びBPTIの間の相互作用を模倣しているという仮定に基づきモデルはt-PAのR₃₀₄がPAI-1のGlu (E₃₅₀) 残基と塩橋を形成することを示唆する。このPAI-1のGlu残基の位置は、トリプシンのY₃₉とアセン・デル・ホールズ結合を形成するBPTIのI₁₉に対応する(下表V11)(Huber, R. 等, J. Mol. Biol., 89:73-101 (1974)) ; 及びBode, W. 等, 於 Proteolysis and Physiological Regulation, Academic Press, New York, 頁43-76 (1976))、従ってPAI-1のE₃₅₀はt-PAのR₃₀₄とイオン対を形成すると思われる。

【0048】第2にt-PAは、t-PA (R₃₀₄) 及びPAI-1 (E₃₅₀) の間の接点と思われる位置に隣接して位置する十分な7個のアミノ酸(₂₉₆KHRRSPG₃₀₂, 図1を参照)を有する。これらの7個のアミノ酸中の4個は正に帯電しており、PAI-1 (₃₅₀EEIIMD₃₅₃) の相補的領域と思われる領域は3個の負に帯電した残基を含む。本発明においては、これらの領域間の静電的相互作用がt-PA及びPAI-1の間の複合体の形成、及び安定化に重要な役割を果たし得ると思われる。逆にt-PAがその基質である。同領域に負に帯電した残基を持たないプラスミノーゲン(PLG)と相互作用を行う場合はこのような相互作用が起こり得ない(上記表V11を参照)。

【0049】図1に示すようなキモトリプシン・スーパーファミリーの種々のセリン・プロテアーゼの配列の比較は、キモトリプシン・スーパーファミリーの種々のセリン・プロテアーゼの1種類又はそれ以上の変異を設計してそれらと同起源の野生型阻害剤による阻害に対して抵抗性を得ることを可能にする。

表V11

	P1	P4'
12	.	24
BPTI	GPCKATIIRYFYN	
343	.	355
PAI-1	VSARMAPEEIIMD	
557	.	569
PLG	CPGRVVGGCVAMP	

第2にt-PAは、t-PA (R₃₀₄) 及びPAI-1 (E₃₅₀) の間の接点と思われる位置に隣接して位置する十分な7個のアミノ酸(₂₉₆KHRRSPG₃₀₂, 図1を参照)を有する。これらの7個のアミノ酸中の4個は正に帯電しており、PAI-1 (₃₅₀EEIIMD₃₅₃) の相補的領域と思われる領域は3個の負に帯電した残基を含む。本発明においては、これらの領域間の静電的相互作用がt-PA及びPAI-1の間の複合体の形成、及び安定化に重要な役割を果たし得ると思われる。

抗性とするための指針として使用することができる。t-P Aと同様に図1に示すキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼは、重要な結合残基（トリプシンのY₃₃₀）及び結合残基に隣接して位置する種々の大きさの挿入残基を含む点でトリプシンと異なる。従って変異の候補の例には以下が含まれる：

(i) 他のセリン・プロテアーゼにおいてトリプシンのTyr (Y₃₃₀) (EPTIの11e (I₃₃₀))と結合し、従って2個のタンパク質間の相互作用において重要な役割を果たす残基)の位置に対応する位置を占めるアミノ酸残基。例えばプラスミンにおいてMet (M)残基はトリプシンのY₃₃₀に対応する位置を占める。このMet残基を電荷、又は大きさなどの性質の異なる他のアミノ酸（例えばGlu (E)）に変異させると、プラスミンのアンチプラスミンによる不活性化に対する感受性がなくなるか、又は減少することが期待されるが、使用する特定の置換アミノ酸は本発明において重要でない。同時にトロンビンのGln (Q)残基（トリプシンのY₃₃₀に対応する位置を占める）を電荷、又は大きさなどの性質が異なる別のアミノ酸（例えばAsp (D)）に変異させると、トロンビンのアンチトロンビン111による不活性化に対する感受性がなくなる、又は減少することが期待されるが、使用する特定の置換アミノ酸は本発明において重要でない。及び

(ii) トリプシンには存在せず、分子の表面の小さい挿入として活性部位の近く位置するキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼの残基（図1を参照）。例えばプラスミンは結合残基に隣接してt-P Aの₂₉₆KHRRSPG₃₀₂により占められている位置に対応する位置に、2個のアミノ酸（RF）の挿入

を含む。これらの2個のアミノ酸のどちらか、又は両方の欠失、又は置換、あるいは少量の別のアミノ酸の挿入による変異により、必ずしもセリン・プロテアーゼの触媒部位に影響することなく阻害剤との相互作用を失わせる、又は減少させることが期待される。もうひとつの例として、u-P Aは結合残基に隣接してt-P Aの₂₉₆KHRRSPG₃₀₂により占められている位置に対応する位置に6個のアミノ酸（RHRGGS）の挿入を含む。これらの6個の残基の変異、又は欠失は変異t-P A（De1₂₉₆₋₃₀₂）の場合に観察される相互作用と類似の方法によるセリン・プロテアーゼ・インヒビターとの相互作用が減少する、又はなくなることを期待される。

【0050】同様に、セリン・プロテアーゼ・インヒビターの活性中心内の領域は非常に変化し易い。セリン・プロテアーゼと相互作用を行う表面の部分を開成する。図2〜3に示すようなセルピリンファミリーの種々のセリン・プロテアーゼ・インヒビターの配列の比較は種々のセリン・プロテアーゼ・インヒビターにおいて、特にセリン・プロテアーゼ・インヒビターのセルピリンファミリーのメンバーに、本発明のキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを有効に阻害することができるような1種類かそれ以上の変異を起こす設計の指針として利用することができる。P A I-1と同様に図2〜3に示した他のセルピリンファミリーのメンバーは、重要な結合アミノ酸残基（P A I-1のE₃₅₀）における配列が異なり、結合残基に隣接した位置に種々の大きさの挿入を含む（下表V I I Iを参照）。

【0051】

表V I I I

セルピリン		344 P1-P1'	358
a	P A I-1	SA-FMAPEE-----IIMDRPF	
r	P A T-1	SA-FMAPTE-----MVLDRSF	
b	P A I-2	TG-ETGHGG----PQFVADHPF	
a	A1AT	IP-MSIPPE-----VKFNKPF	
b	A1AT	IP-MSIPPE-----VKFNKPF	
m	A1AT	VP-YSMPP I-----LRFDHPF	
r	GHRP	L--KSLPQTI--PLLNFNRPF	
e	AClym	TL-LSALVETR TI-VRFNRPF	
m	Cntrps	GIRKAILPA-----VHFNRPF	
e	AT I I I	AG-RSLNPN--RVTFKANRPF	
h	HC I I	MP-LSTQVR-----FTVDRPF	
h	A2AP	S--RMSLSS-----FSVNRPF	
h	Clinh	AA-FILLV-----FEVQQPF	
e	PCinh	TF-RSARLN--SQRLVFNRPF	
r	Nex-1	A--ESSPPW-----FIVDRPF	

(h=ヒト；r=ラット；b=ひび；およびm=マウス)

従って変異の候補の例には以下が含まれる：

(i) 他のセリン・プロテアーゼ・インヒビターにおい

て、PAI-1のGlu (E₃₅₀) (t-PAのArg (R₃₀₄)と結合し、従って2価のカチオン質の相互作用において重要な役割を果たす残基)の位置に対応する位置 (P4') を占めるアミノ酸残基。本発明においては、t-PAにおけるR₃₀₄→E変異の構築によりこめられた静電的相互作用を復活させるためにPAI-1 (E₃₅₀)のGlu残基をArg (R)に変異させた。このセルビンにおける特異的な変異は、セリン・プロテアーゼに導入され野生型セルビンによる阻害に対する抵抗性を付与した変異と相補的であるように構築された。セルビンにおけるこの相補的E₃₅₀→R変異はセルビンに本発明のキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害する能力を与えるために特別に選んだ、しかし使用した特定の置換アミノ酸は本発明に対して重要ではない。例えばトリプシンのY₃₈に対応するアラジンのMet (M)残基 (図1参照)を電荷又は大きさなどの性質の異なる別のアミノ酸 (上記の例のようにGlu (E))に変え、変異アラジンは野生型アルファ₁-アンチトリプシンによる阻害に対する感受性の減衰を介した場合、アルファ₁-アンチトリプシンのP4' Ser (S)残基を、アラジンの位置に代わったGlu残基と相互作用のできる他のアミノ酸 (例えばArg (R))に変異させると、変異アルファ₁-アンチトリプシンによる不活性化に対する変異アラジンの感受性が復活することが期待される。同様にトリプシンの変異に関する上記の例のようにトリプシンのGlu (Q)残基Asp (D)に変えた場合、アンチトリプシン-111のP6' Arg (R)残基をGlu (E)に変異させると変異アンチトリプシン-111による阻害に対する野生型インヒビター抵抗性トリプシンの感受性が復活することが期待される。

(c) 同種のセリン・プロテアーゼとの相互作用表面を形成する、種々のファミリー・セリン・プロテアーゼ・インヒビターの他のファミリーの活性中心内余分な残基。セリン・プロテアーゼ・インヒビターのセルビンファミリーに関してこれらの残基を上記の表V I I Iに示す。

例えばアルファ₁-アンチトリプシンは活性中心のPAI-1の₃₄₈APEEIIMD₃₅₃に対応する位置に配列SLSSF SVNを含む。これらの8個のアミノ酸のいずれかの置換により、又は少量の別のアミノ酸の挿入により変異を起こすと、これらの置換又は挿入が電荷、大きさ、あるいは疎水性などの性質において、セリン・プロテアーゼに導入されて最初に野生型セルビンに対する抵抗性を付与したアミノ酸残基と相補的であればセリン・プロテアーゼとの相互作用を復活することが期待される。

【0052】本発明の変異セリン・プロテアーゼ、及び変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、例えば

リボヌクレオチド・媒介突然変異誘発などの周知の方法により製造することかできる (Zoller, M. 等, DNA, 3:479-488 (1984); Kunkel, T. 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82:488-492 (1985); 及びKunkel, T. 等, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1987))。しかしセリン・プロテアーゼ、又はセリン・プロテアーゼ・インヒビターに変異を起こす正確な方法は本発明にとって重要ではない。

【0053】本発明の変異セリン・プロテアーゼは、Lottenberg, R. 等, Meth. Enzymol., 80:341-361 (1981)に記載の方法などの周知のアッセイを用いて所望の性質、すなわちセリン・プロテアーゼ活性、及び同起縁の阻害剤による阻害に対する抵抗性を持つセリン・プロテアーゼに関してスクリーニングを行うことができる。

【0054】本発明の変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、Lottenberg, R. 等, Meth. Enzymol., 80:341-361 (1981), Holmes, W. E. 等, Biochem., 26:5133-5140 (1987), 及びHeckman, C. M. 等, Arch. Biochem. Biophys., 262:199-210 (1988)に記載の方法などの周知のアッセイを用いて所望の性質、すなわち本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼに対するセリン・プロテアーゼ・インヒビター活性を有するセリン・プロテアーゼ・インヒビターに関してスクリーニングを行うことができる。

【0055】本文に記載する研究は、セリン・プロテアーゼを突然変異誘発により修正し、キモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ、及びそれと同起縁の阻害剤の間で相互作用を減少させる、又はなくすることが可能であることを初めて示すものである。これにより変異セリン・プロテアーゼは同起縁の阻害剤の存在下で野生型の酵素より酵素活性が多く残り、残留活性の量はそれと同起縁の阻害剤との相互作用が阻害される程度に依存している。そのような変異セリン・プロテアーゼの投与は多種類の臨床的、及び商業的用途において有益であると思われる。例えば活性化プロテインCの変異型は、血液の凝固を阻害するのが有利である場合有用であると思われ、本文の実施例1に記載のt-PAの変異型が、フィブリン溶解現象を延長する必要がある場合に血栓性の異常のある患者の循環におけるt-PAの有効寿命を延ばすのに有用であると思われるのと同じである。

【0056】本文に記載した研究は又、セリン・プロテ

アーゼーインヒビターを突然変異誘発により修正し、セリン・プロテアーゼーインヒビターの構造を適切に変化させることにより、キモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼーインヒビター抵抗性変異セリン・プロテアーゼ、及びそれと同起源のセリン・プロテアーゼーインヒビター間の相互作用を機能的に復活させることが可能であることを初めて示すものである。これにより同起源の野生型セリン・プロテアーゼーインヒビターが存在する場合より急速に変異セリン・プロテアーゼを不活性化することができ、阻害の速度は変異セリン・プロテアーゼとの相互作用が復活した程度に依存する。このような変異セリン・プロテアーゼーインヒビターの投与は、多種の臨床的及び産業的用途においてセリン・プロテアーゼーインヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼの活性を制限するのに有益であると思われる。例えばプロテインCーインヒビターの変異型は、活性化プロテインCの変異型の存在下で血液の凝固を促進するのが有利であるような場合に有用であると思われる。同様にPAI-1の変異型は、侵入的な方法が必要な場合に、血栓性異常の治療をした患者の循環においてセリン・プロテアーゼーインヒビター抵抗性t-PA、例えばt-PA (R₃₀₄→E)の有効寿命を短縮するのに有用であると思われる。従ってこのような変異セリン・プロテアーゼーインヒビターはセリン・プロテアーゼーインヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼの解毒薬として使用することができ、

【0057】臨床的用途において投与すべき本発明の変異セリン・プロテアーゼの量は使用する特定の変異セリン・プロテアーゼ、所望するセリン・プロテアーゼの治療効果、及び性別、年齢、体重、ならびにプロテアーゼを投与する患者の生理学的条件などの因子に依存するであろう。変異セリン・プロテアーゼの使用量は日常の実験により決定することかできる。臨床的用途において投与すべき本発明の変異セリン・プロテアーゼーインヒビターの量は使用する特定の変異セリン・プロテアーゼーインヒビター、所望するセリン・プロテアーゼーインヒビターの治療効果、及び性別、年齢、体重、ならびにセリン・プロテアーゼーインヒビターを投与する患者の生理学的条件などの因子に依存するであろう。変異セリン・プロテアーゼーインヒビターの使用量は日常の実験により決定することかできる。

【0058】本発明の変異t-PAは適したインヒビトロ、及びインヒボ・モデルにおける試験、ならびに臨床試験により決定した通りに投与しなければならない。必要な投薬量は野生型t-PAの場合の必要量の10-1

000分の1となるであろうと思われる。

【0059】本発明の変異PAI-1も適したインヒビトロ、及びインヒボ・モデルにおける試験、ならびに臨床試験により決定した通りに投与しなければならない。必要な投薬量は変異t-PAの場合に必要な量と大体同じであると思われる。

【0060】本発明の変異セリン・プロテアーゼは文献により周知のいずれの製造上許容できるキャリアー、又は希釈剤、例えば生理食塩溶液と共に投与することかできる(Lucore, C. L. 等, *Circ.*, 77:660-669 (1988)、及びChesebro, J. H. 等, *Circ.*, 76:142-154 (1987))。

【0061】本発明の変異セリン・プロテアーゼの特定の投与形態はその特定の用途に依存する。そのような投与形態の例には、静脈内又は腹腔内注射、冠動脈内注入、局所的適用、及びエーロゾル吸入が含まれる。

【0062】本発明の変異セリン・プロテアーゼーインヒビターの特定の投与形態はその特定の用途に依存する。そのような投与形態の例には、静脈内又は腹腔内注射、冠動脈内注入、局所的適用、及びエーロゾル吸入が含まれる。

【0063】以下の実施例は説明のみを目的としており、本発明の範囲をどのようにも制限するものではない。

【0064】

【実施例】実施例1

t-PA変異株

本実施例に記載する方法はセリン・プロテアーゼとしてt-PAを使用し、同起源のセリン・プロテアーゼーインヒビターとしてPAI-1を使用する場合を対象とするが、上記のようなキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼ、及び上記のようなそれと同起源の阻害剤も本発明の精神と範囲から逸脱することなく本文に記載の方法により容易に使用することができ、

【0065】A. 突然変異誘発のためのt-PA部位の選択

t-PAの残基Arg₃₀₄及び¹²⁹⁶KHRKSPG₃₀₂がPAI-1と相互作用をするという仮定を試験するため、オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発を用いて下表IXに示すt-PAの3種類の変異型を製造した。

【0066】

表IX

野生型t-PA	FAKHRRSPGERFLC
t-PA (Arg ₃₀₄ →S)	FAKHRRSPGESFLC

t-PA (Arg₃₀₄→E)

t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)

変異 t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂) は上記で議論したト
ロピジンには存在しない7個のアミノ酸挿入を含まず、
同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-
1と相互作用する部分の t-PA 配列を完全に除去し
て構築した。変異株 t-PA (R₃₀₄→S) 及び t-
PA (R₃₀₄→E) は Arg₃₀₄ がそれぞれ Ser 及び
Glu に置換されており、正に帯電した Arg 残基を選
択的に変え、それと同起源のセリン・プロテアーゼ・イ
ンヒビター、PAI-1 との相互作用を除去するように
選んだ。R₃₀₄ に対して、電荷対相互作用の欠落のため
に同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビターに対す
る感受性の減化した t-PA を与える種々の他の置換を
行うことができる。例えばループ中の正に帯電した残基
(残基296-302) を負に帯電した、又は中性のア
ミノ酸に変える点変異は、t-PA 及び PAI-1 の間の
相互作用を妨げる、減小させる、又は不安定化すると
予測される。R₃₀₄ を Gly (G) 以外の他のアミノ酸
で置換することにより類似の結果を得ることができる。
さらに残基304と305の間、又は残基296と30
5の間のごく近くに、PAI-1の残基と全く相互作用し
ない約1-6個のアミノ酸の系列を挿入するように挿入
変異を行うことができる。異なる置換、及び、又は置
換、挿入及び欠失の組み合わせは、t-PA と PAI-
1 の相互作用に異なる程度で影響し、それによって特定
の用途、又は臨床的条件に適する性質を持った種々の t-
PA を製造することができるであろう。

【0067】B. t-PA のオリゴヌクレオチド-媒介
突然変異誘発

t-PA のオリゴヌクレオチド-媒介突然変異誘発は基
本的に Zoller, M. 等, DNA, 3: 479-4
88 (1984) の記載に従い、Kunkel, T.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8
2: 488-492 (1985); 及び Kunkel,
T. 等, Current Protocols in
Molecular Biology, Green P
ublishing Associates & Wi
ley-Interscience, New York
(1987) による修正により行った。

【0068】第1に、ヒトの t-PA 全長をコードする
cDNA をクローニングした複製を含むプラスミド pSV
T7 (RI) の t-PA を、Sambrook,
J. 等, Mol. Biol. Med., 3: 459-4
81 (1986) に従って用意した。pSVT7 (RI)
の t-PA は pSVT7 の誘導体である (Bir
d, P. M. 等, J. Cell Biol., 105:
2905-2914 (1987)) (図4を参照)。

【0069】pSVT7 は pKC3 から構築した。pK
C3 は、Ava I 部位から EcoRI 部位までの pBR

FAKRRSPGEEFLC

FA. ERFLC

322-誘導配列 (これは複製の源、及びβ-ラクタマ
ーゼ遺伝子を含む) の pUC-8 (Messing,
J., Meth. Enzymol., 101: 20-7
8 (1983)) の配列に置換されている pko (Va
n Doren, K. 等, J. Virol., 50: 6
06-614 (1984)) の誘導体である。さらに独
特の HindIII 部位にポリリン酸が挿入されてお
り、SV40 オリジン上の PvuII 部位上流が ClaI
部位に変換されている。ベクター pSVT7 は、ポリリ
ヌクレオチド T7-RNA-オリゴヌクレオチド特異性プロモ
ーターを含む20個の塩基対フラグメント (Pharm
acia Fine Chemicals, Piscat
away, NJ) を pKC3 の独特の StuI 部位に挿
入することによって得た。この StuI 部位は SV40
の初期領域から誘導した配列内の SV40 配列のヌクレ
オチド5190の位置、初期転写の開始点から下流約3
0塩基対にある (Floozie, J. 等, DNA Tum
or Viruses, Cold Spring Ha
rbor Press, 頁813 (1981))。

【0070】その後 E. coli DNAポリメラーゼ
のクレノウフラグメントを用いて、ほんた3'-末端を
満たすことにより単一の EcoRI 部位を pSVT7 から
除去した。得られた発現ベクターを pSVT7 (RI
7) と称する (図4を参照)。

【0071】次に野生型 t-PA をコードする cDNA
をプラスミド pL611 から切り出し (Sambroo
k, J. 等, Mol. Biol. Med., 3: 459
-481 (1986); Genetics Instit
ute, Boston, MA から提供)、pSVT7
(RI7) に挿入した。pL611 は t-PA の AUG
開始コドンからすく上流に NcoI 及び BamHI の切
断部位を導入する合成オリゴヌクレオチドを含む。t-
PA cDNA の3' 非翻訳配列内の、TGA 終結コド
ンの下流約280塩基対の位置に BclI 部位がある。
プラスミド pL611 から切り出した t-PA DN
A の約1965塩基対 NcoI-BclI フラグメント
に XbaI リンカーを加えた。この BclI-BclI
フラグメントは完全な t-PA タンパク質をコードする
配列を含むが、(1) t-PA mRNA の3' 非
翻訳領域、及び (2) t-PA mRNA の5' 非
翻訳領域全体、すなわち SalI 部位及び ATG 開始コ
ドンの間の配列に対応する配列が欠けている (Penn
ica, D. 等, Nature, 301: 214-22
1 (1983))。各末端に XbaI 部位を持つ t-P
A cDNA のフラグメント (Sambrook, J.
等, Mol. Biol. Med., 3: 459-481
(1986)) を pSVT7 (t-PA の製造に使用し
た (図4を参照)。得られたプラスミドから XbaI を

用いた消化。0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動による精製により約1970塩基対DNAフラグメントを切り出し、t-PAのN-末端をコードする配列がバクテリオファージ T7及びSV40初期プロモーターのすぐ下流におかれるようにしてプラスミドpSVT7 (RI7) のXba I部位に挿入した。得られたプラスミドをpSVT7 (RI7) /t-PAと称した (図4を参照)。

【0072】その後pSVT7 (RI7) /t-PAをEcoRIを用いて完全に消化した。t-PAの472塩基対フラグメント (アミノ酸206-364を含む領域をコードする[アミノ酸]842-1314) を1.2% (w/v) アガロースゲル電気泳動により精製した。このフラグメントを、前記EcoRIで消化した腸アルカリホスファターゼを用いて脱ホスホリル化した。バクテリオファージM13-ベクターM13mp18 (Yanish-Perron, C. 等, *Gene* 33:103-119 (1985)) の複製型DNAと連結した (図4を参照)。

【0073】他に特定しない場合は本文に記載するこれらの、及び他の標準的組み替えDNA法は (i) Maniatis, T. 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第1

t-PA (R ₃₀₄ -S)	5' GCCCGAGAGGCTTCTGTGC 3'
t-PA (R ₃₀₄ -E)	5' GCCCGAGAGGAGTTCTGTGC 3'
t-PA (De1 ₂₉₆₋₃₀₂)	5' GCCATCTTTGCCGAGCGGTTCTGTGC 3'

上記厚案はdut⁻, ung⁻であるE. coliの株、すなわち株CJ236において製造したDNA鋳型を使用する (Kunkel, T. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488-492 (1985))、及びKunkel, T., *Meth. Enzymol.*, 154:367-382 (1987))。DNA鋳型はサミンの位置に1量のウラシル残基を含む。

【0076】突然変異誘発プライマーをインビトロで伸ばした後、部分的な塩環状DNAをdut⁻, ung⁻であるE. coliの株、すなわちTG-1にトランスフェクトした (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984))。鋳型らせん中のウラシル残基を酵素ウラシル-N-グリコシラーゼの作用によりインビトロで除去した。これにより鋳型らせんに致死損害が加えられ、変異株を迅速に、及び有効に回収することができる。

【0077】特に、ウラシル含有鋳型DNAを上記した5'ホスホリル化突然変異誘発プライマーにアニール

版, Cold Spring Harbor (1982)、及び (ii) *Meth. Enzymol.*, 152巻, 出版Berger, S. 等, Academic Press, New York (1987) に記載の要領で行った。

【0074】連結DNAをE. coli株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984)) にトランスフェクトした。組み替えバクテリオファージにより形成された白いプラークを採取し、適切な472塩基対EcoRIフラグメントの存在を制限マッピング、セザンハイブリッド形成、及びDNA配列決定により確認した。

【0075】Kunkel, T. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488-492 (1985)；及びKunkel, T., *Meth. Enzymol.*, 154:367-382 (1987) の記載に従い、5'ホスホリル化突然変異誘発プライマーを用いて472塩基対EcoRIフラグメントにおける変異を導入した。t-PA変異株の構築に使用した3種類の突然変異誘発プライマーの配列は以下である。

した。プライマーの伸長はE. coli DNAポリメラーゼのクレノラフラグメントを用いて15°Cにて12-16時間行った。新規に合成したらせんをバクテリオファージT4 DNAリナーゼを用いて突然変異誘発プライマーの5'末端に連結し、不適正を持つ環を形成した。得られたDNAを用いてE. coli株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984)) のトランスフェクションを行い、多くのプラークから一重鎖DNAを製造した。これらのDNAの配列を完全に決定した。その後立証された変異株の複製型2重鎖DNAを、EcoRIによる消化、及び1.2% (w/v) アガロースゲルによる電気泳動により分離した。下記に詳細に記載する通り、変異を含むこれらのフラグメントを使用して問題のt-PA変異株をコードするt-PA + DNAの構築を構築した。

【0078】C. 変異株t-PAのための発現ベクターの構築

プラスミドpSVT7 (RI7) /t-PAにおけるt-PAの変異株は以下のようにして構築した：t-PA

cDNAの中心472塩基対EcoRIフラグメントをEcoRIによる消化、及び1.2% (w/v) アガロースゲルによる電気泳動によりpSVT7 (RI7) / t-PAから除去した。その後残ったプラスミドDNAの直線状フラグメントをオリゴヌクレオチド-媒介-突然変異誘発によって作った472塩基対フラグメントのクローニグに連結した(図4を参照)。得られたプラスミドをpSVT7 (RI7) / t-PA (R₃₀₄-S), pSVT7 (RI7) / t-PA (R₃₀₄-E), 及びpSVT7 (FI7) / t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂) と称した。

【0079】E. coli株DH-1 (Hanahan, D. 等, DNA Cloning, 1巻, 出版: Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁109-135 (1985)) を上記の突然変異株プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpSVT7 (RI7) / t-PA (R₃₀₄-S) [DH-1], pSVT7 (RI7) / t-PA (R₃₀₄-E) [DH-1], 及びpSVT7 (FI7) / t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂) [DH-1] と称した。正しいフラグメントの存在は適した放射標識突然変異誘発オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成により確認し、フラグメントの配向は適した突然変異誘発オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた制限マッピング、及びDNA配列決定により確認した。

【0080】pSVT7 (RI7) / t-PA (R₃₀₄-S) [DH-1], pSVT7 (RI7) / t-PA (R₃₀₄-E) [DH-1], 及びpSVT7 (FI7) / t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂) [DH-1] はAmerican Type Culture CollectionにそれぞれATCC番号67894, 67896及び67895として供託した。

【0081】D. COS細胞のトランスフエクション 次に100mmの皿当たり約10⁶個のCOS細胞 (Gluzman, Y. 等, Cell, 23:175-182 (1981)) をアルカリリシス法により精製した。1.0 µgの適したプラスミドDNAを用いてトランスフェクトした (Maniatis, T. 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1版, Cold Spring Harbor (1982))。特に、吸引により培地をCOS細胞から除去し、単層を10mMのHEPES (pH 7.15) (Sigma Chemical Co.) を含む5.0 mlのダルベッコの培地 (GIBCO, Inc.) で1回洗浄した。洗浄液を除去した後、300 µgのDEAE-デキストラン (Pharmacia, Inc.) を含む1.5 mlの洗浄液中の単層にプラスミドDNAを加えた。その後単層を0.0% CO₂を含む湿潤大気中、37℃にて1時間インキュベートした。この間20分毎に単層をおだやかに撹拌した。

単層をプラスミドDNAに1時間暴露した後、10mMのHEPES (pH 7.15) を含むダルベッコの培地で1回洗浄し、10% (v/v) の牛胎児血清 (GIBCO, Inc.) を含む10 mlのダルベッコの培地、及び100 µMのニコチン (Sigma Chemical Co.) を加えた。その後単層を上記に従い37℃にて4時間インキュベートし、牛胎児血清を含まず10mMのHEPES (pH 7.15) を含むダルベッコの培地で5.0 mlで2回洗浄した。その後10% (v/v) の牛胎児血清を含む10 mlのダルベッコの培地を加え、単層を上記に従い37℃にて12時間インキュベートした。そして単層を牛胎児血清を含まないそれぞれ5.0 mlのダルベッコの培地で3回洗浄し、同培地中、37℃にてさらに30-60時間インキュベートした。DEAE-デキストランを含む溶液からプラスミドDNAを省略する以外は同様の方法で細胞トランスフェクション細胞を処理した。インキュベーション期間の最後に上澄み培地を細胞から集め上記に従い分析した。

【0082】E. 固相ラジオアッセイによる野生型、及び変異t-PAの定量

固相ラジオアッセイは基本的にインメルゴザH Aに関して記載されている方法に従い (Gething, M. J. 等, Nature, 293:620-625 (1981))、精製ヒトt-PAに対するうさぎの抗血清1 µg/ラウエルを用いて行い、COS細胞中の製造された野生型、及び変異t-PAの量を定量した。この方法によって決定したt-PAの濃度は0.5-1.0 µg/mlであった。

【0083】F. 野生型、及び変異t-PAの酵素によるアッセイ

COS細胞中に製造された野生型、及び変異株t-PAの活性を決定するため、間接的酵素分析法を行った。このアッセイにおいては、遊離のp-ニトロアニリンが色基質の基質、又はヒト組織型PL (H-D-プロテオミルホキサヒドロキサリル-リジン-p-ニトロアニリン二酢酸塩) (American Diagnostica, Inc.) から、プラスミド-ゲル上のt-PAの作用により生成されたプラスミドの作用により放出される。遊離のp-ニトロアニリンの放出は分光光度分析によりOD_{405 nm}にて測定した。

【0084】特に、150-200 µgの試験すべきt-PA、0.4 mMのジペプチル PL、0.1 µMのLys-ブラスミノーゲン (American Diagnostica, Inc.)、及び0.5-2.5 µg/mlの可溶性フィブリン (Des-A-フィブリン-ブラスミノーゲン) (American Diagnostica, Inc.) を、50 mMのトリス-HCl (pH 7.5)、0.1 MのNaCl、1.0 mMのEDTA、及び0.01% (v/v) のイオン80から成る緩衝液中に含む反応混合物を96ウェルの平底マイクロタイタ

プレート (Costar, Inc.) 中で37℃にて、1. キュベートし、2時間の間15又は30分間隔でBio-tekマイクロプレートリーダーを弄いてOD_{405 nm}を測定した。偽トランスフェクション細胞からの検出液、又は適切に希釈した試料のアッセイを標準として分析し、得られたOD値 (<0.01単位) を対応する試験値から差し引いた。各々のOD値を30分と60分の間のもつ濃度の変化として、すなわち反応の遅滞期、及び1本鎖t-PAから2本鎖の形態への完全な変換による変化として測定した。標準的アッセイに使用する条件下で、0.1 μ MのLys-プラスミノーゲン及び25 μ g/mlのDes-A-フィブリノーゲン、可溶性フィブリンはt-PAの活性を20-40倍賦活した。結果を図5に示す。

【0085】図5に示す通り、上記の本発明のt-PA変異株の3種類全部が酵素として活性であり、その活性の特異性は野生型の活性と大きく異なるものではないことが見いだされた。さらに上記の本発明のt-PA変異

酵素
野生型 t-PA
t-PA (R ₃₀₄ →S)
t-PA (R ₃₀₄ →E)
t-PA (De1 ₂₉₆₋₃₀₂)

上記の表に示す通り、異なるt-PA変異株に関するK_m及びK_{cat}値は互いに類似していた。又、それらの値はBoose, J. 等, Biochem., 28:635-642 (1989); 及びHaylwerths, M. 等, J. Biol. Chem., 257:2912-2919 (1982) により報告されている野生型t-PAに関する値とも類似している。

【0088】図5及び表Xに示されたデータは (i) t-PAのアミノ酸296-302の欠失、及び (ii) 304位のArgのSer又はGluへの置換が、プラスミノーゲンを活性化する、及び可溶性フィブリン-フィラメントにより賦活されるt-PAの能力にほとんど影響しないことを示している。

【0089】アミノ酸296-302の欠失、及びArg₃₀₄の置換がt-PAとPAI-1の相互作用に影響するかどうかを調べるために、それぞれ250 pg (4.8フェントモル) の野生型、及び変異株t-PAを0-480フェントモル (femtomoles) の部分的に精製した組み替えPAI-1と共に20分間予備的にインキュベートした。その後上記の間接的色素法により残留酵素活性を測定した。部分的精製組み替えPAI-1は上記の実施例2に記載にしたがって得た。結果を図6に示す。

【0090】図6に示す通り、3種類の本発明のt-PA変異株のすべてが野生型t-PAと全く異なる挙動を示した。すなわち野生型t-PA (■) がPAI-1に

株は野生型t-PAと類似の方法でDes-A-フィブリノーゲンの濃度の変化に応答することが見いだされた。Des-A-フィブリノーゲンによる最適刺激は20-40倍であった。これはDes-A-フィブリノーゲン製造を止めた野生型t-PAについての他の観察と一致する (Karlson, B. 等, Biochem. Biophys. Res. Comm., 142:147-154 (1987))。それぞれの場合、Des-A-フィブリノーゲンの濃度が約1.0 μ g/mlの場合に半最適刺激が起きた。

【0086】次に飽和濃度のDes-A-フィブリノーゲン (25 μ g/ml)、及び種々の濃度 (0.02-0.16 μ M) の基質、Lys-プラスミノーゲンの存在下における種々の形態の酵素のアッセイにより、野生型及び変異株t-PAのK_m及びK_{cat}値を決定した。結果を表Xに示す。

【0087】

表X

K _m (μ M)	K _{cat} (s ⁻¹)
0.024	0.22
0.019	0.23
0.023	0.22
0.029	0.17

より完全に阻害される条件下で (24フェントモルのPAI-1)、欠失変異株t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)

(○) はその活性の約95%を保持していた。高濃度のPAI-1 (480フェントモルのPAI-1) が存在する場合に初めて変異株t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)

(○) の酵素活性がかなりの減衰を示した。2種類の置換変異株、すなわちt-PA (R₃₀₄→S) (□) 及びt-PA (R₃₀₄→E) (□) も程度は異なるがPAI-1による阻害に対して抵抗性であった。又、図6に示す通り、Argの代わりにSer又はGluを含む2種類の置換変異株がその酵素活性の半最適阻害に要するPAI-1の量は野生型t-PAのそれぞれ4及び25倍であった。

【0091】上記データは、アミノ酸296-302及び304がt-PAの酵素機能に含まれておらず、同種のセリン-プロテアーゼ-インヒビター PAI-1と酵素の相互作用に重要な役割を果たすことを示している。モデルとしてトリプシンの構造を用いて、これらのアミノ酸がセリン-プロテアーゼの活性部位の近辺、及び触媒性3回回転軸からある程度離れた位置にあることが予想される。したがってt-PAとPAI-1の接触面積はt-PAとその本来の基質であるプラスミノーゲンの相互作用より広い。

【0092】変異株t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂) もヒトの血漿中に存在するセリン-プロテアーゼ-インヒビターの複合混合物に対して抵抗性を示すかどうかを調べる

ために、上記の原案において部分的精製粗み替えPAI-1をヒトの血漿の1:100希釈液に置換した。この条件下で野生型t-PAの活性の約70%が阻害されたがt-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)の活性は影響を受けなかった。

【0093】さらに野生型t-PA及びt-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)を、希釈しないヒトの血漿と共にインキュベートし、混合物を酸化してpH5.0とし、12,000xgで5分間遠心した。透明になった上清みを希釈し、残留t-PA活性に関して分析すると変異t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)の場合90%であり、野生型t-PAの場合20%以下であった。上記の結果は変異t-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)がヒトの血漿中に存在するセリン-プロテアーゼインヒビターの複合混合物に対して抵抗性であることを示しており、したがって治療薬として野生型t-PAより優れているとされる。

【0094】G. 5' t-PA変異株

上節Fに示したデータはt-PAの残基296-302及び304が酵素、及び同起線の阻害剤、PAI-1の相互作用に重要な役割を果たすが、基質、Lys-プラーズミン-ゲンとの相互作用には影響しないことを示す。トリプシンの周知の構造に基づいたt-PAの触媒ドメインのモデルは、残基296-302が酵素の活性部位の端において表面ループを形成することを示唆して

t-PA (K₂₉₆->E) 5'-ATCTTTGCCGAGCACAGGA-3'
t-PA (H₂₉₇->Y) 5'-TTTGCCAAGTACAGGAGGT-3'
t-PA (K₂₉₈->E) 5'-GCCAAGCAGGAGGTCGCC-3'
t-PA (R₂₉₉->E) 5'-AAGCACAGGAGTCCGCC-3'
t-PA (P₃₀₁->G) 5'-AGGAGGTCGGGCGGAGAGCG-3'
t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E)
5'-GCCATCTTTGCCGAGCACAGGAGTCCGCCGAGGA-3'

変異酵素t-PA (K₂₉₆->E), t-PA (H₂₉₇->Y), t-PA (R₂₉₈->E)及びt-PA (P₃₀₁->G)を上記の要領で遷移発現ベクターpSVT (RI)に連結した。

【0097】変異酵素t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E)及びt-PA (R₂₉₉->E)をコードするcDNAを遷移発現ベクターpSTEに連結した。pSTEはpSVT7の誘導体であり、pSVT7の350bp ClaI-HindIIIプロモーター-ポリリン-フラグメントをSV40-cs1085のプロモーター-ポリリン領域から418bp HpaLL-HindIIIフラグメントで置換することにより構築した (Dimario, D. 等, J. Mol. Biol., 140:129-142 (1980))。

【0098】得られたプライマーをpSVT7 (RI) / t-PA (K₂₉₆->E), pSVT7 (RI) / t-PA (H₂₉₇->Y), pSVT7 (RI) / t-PA (R₂₉₈->E), pSTE7 (RI) / t-PA

いる。このループは正の高い電荷を帯びている。節A及びFで議論した通り、この領域の効果がPAI-1との静電的結合の形成に媒介されているという考えが本発明において提出された。この仮定を試験のために、ループ内の帯電した残基をそれぞれを変え、酵素のPAI-1との相互作用に与えるその変異の効果を上記に従って評価した。ループ中の正に帯電した残基がセリン-プロテアーゼインヒビター、PAI-1の相補的領域と塩橋を形成するならば、負に帯電した残基で置換すると、これらの2つのタンパク質の会合の際に同一に帯電した残基が並列するためt-PAとPAI-1の相互作用は崩壊すると予想される。

【0095】特に、節Bに記載した要領で特定部位の突然変異誘発を行い、Lys₂₉₆, Arg₂₉₈, 又はArg₂₉₉がGlu残基により置換されたt-PA変異株をコードするcDNAの構築に使用した。これらの3個の残基のすべてがGluに置換された、t-PAの3重変異株をコードするcDNAも構築した。さらに2個のcDNAを製造した；ひとつはHis₂₉₇がTyr残基により置換されたt-PA変異株をコードし、他方はPro₃₀₁がGlyにより置換された酵素をコードする。

【0096】これらのt-PA変異株の構築に使用した6種類の突然変異誘発プライマーの配列は以下である：

A (R₂₉₉->E), pSVT7 (RI) / t-PA (R₃₀₁->G) ; 及びpSTE7 (RI) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E) と称した。

【0099】E. coli株DH-1 (Hanahan, D. 等, DNA Cloning, 1巻, Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁109-135 (1985))を上記の変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpSVT7 (RI) / t-PA (K₂₉₆->E) [DH-1], pSVT7 (RI) / t-PA (H₂₉₇->Y) [DH-1], pSVT7 (RI) / t-PA (R₂₉₈->E) [DH-1], pSTE7 (RI) / t-PA (R₂₉₉->E) [DH-1], pSVT7 (RI) / t-PA (R₃₀₁->G) [DH-1] ; 及びpSTE7 (RI) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉->E, E, E) [DH-1] と称した。正しいフラグメントの存在を、適した放射性突然変異誘発オリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成により確認し、フラグメン

トの配向を、適した突然変異誘発オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用した制限マッピング 及びDNA配列決定により確認した。

【0100】 pSVT7 (R17) / t-PA (R₂₉₈→E) [DH-1] ; pSTE7 (R17) / t-PA (R₂₉₉→E) [DH-1] ; 及び pSTE7 (R17) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) [DH-1] を American Type Culture Collection にてそれぞれ ATCC 番号 68157, 68154 及び 68153 として供託した。

【0101】 上記プラスミドDNAはその後上記の要領

酵素	
野生型 t-PA	
t-PA (K ₂₉₆ →E)	
t-PA (R ₂₉₇ →Y)	
t-PA (R ₂₉₈ →E)	
t-PA (R ₂₉₉ →E)	
t-PA (P ₃₀₁ →G)	
t-PA (K ₂₉₆ , R ₂₉₈ , R ₂₉₉ →E, E, E)	

上記の表X1の示す通り、上記で議論したいずれの変異も t-PA とその基質との相互作用を変化させなかった。

【0104】 同様に図7に示したデータは、変異が t-PA とその正のエクソクターである Des-A-フィブリノーゲンとの相互作用を変えなかったことを示している。逆に図8に示したデータは野生型 t-PA と変異 t-PA のいくつかの挙動における明確な差を示している。特に3種類の変異株 t-PA、すなわち t-PA (R₂₉₈→E)、t-PA (R₂₉₉→E) 及び t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) の場合、セリン、PAI-1 と正常に相互作用する能力が実質的に変化した。特に三重変異株の挙動は顕著である；200倍モル以上過剰の PAI-1 と共に予備的インキュベーションを行った後でさえ活性の損失を示さない。これらの発見は t-PA の表面ループ、すなわち残基 396-302 が特異的に同起原の阻害剤 PAI-1 と相互作用するという提案を支持しており、この相互作用に Arg₂₉₈ 及び Arg₂₉₉ が含まれることを示唆している。これらの観察は t-PA、及び PAI-1 の間の特異的相互作用に静電的結合が含まれるという仮定を満足する。これらの相互作用に含まれる t-PA の残基は Arg₂₉₈, Arg₂₉₉ 及び Arg₃₀₄ である。

【0105】 実施例2

PAI-1 変異株

本実施例に記載する方法はセリン プロテアーゼとして t-PA を、及びセリン プロテアーゼ インヒビターとして PAI-1 を使用する場合を対象としているが、

でCOS細胞のトランスフェクションに使用した。得られた条件下の培地の希釈液（典型的には1:300）、及び免疫精製酵素の両方を用いて上記の要領でアッセイを行った。

【0102】 次に飽和濃度の Des-A-フィブリノーゲン (25 µg/ml) 及び種々の濃度 (0, 0.2-0.16 µM) の基質 Lys-プラスミノーゲンの存在下における種々の形態の酵素のアッセイにより野生型 及び変異株 t-PA の K_m 及び K_{cat} 値を決定した。結果を表X1に示す。

【0103】

表X1

K _m (µM)	K _{cat} (s ⁻¹)
0.024	0.22
0.026	0.22
0.017	0.14
0.027	0.24
0.033	0.26
0.027	0.24
0.027	0.24

上記のようなキセトリプレイン スーパーファミリーの他のセリン プロテアーゼ、及び上記のような他のセリン プロテアーゼ インヒビターを、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく本文の方法を用いて容易に使用することができる。

【0106】 A 鼠胚細胞における PAI-1 の発現、精製、及びアッセイ

PAI-1 をコードする 3.2 kb 及び 2.2 kb mRNA から誘導した2種類の cDNA クローン (Ny, T 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6776-6780 (1986))、及び Pannekoek, H. 等, EMBO J., 5, 2539-2544 (1986)) を使用して哺乳類発現ベクター中に全長の cDNA を構築した。第1のクローン、ラムダ PAI-1 は、ヒトの胎盤性 cDNA ライブラリからスクリーニングにより得た cDNA の先端を切り取ったベクターであり (Dr. Carol Mendelson, Center, Department of Biochemistry, Southwestern Medical Center, Dallas, TX より提供) PAI-1 の以下の8アミノ酸配列に対応する合成オリゴヌクレオチドを有する (AVDQLTRLE) (Ny, I. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6776-6780 (1986))；及び Pannekoek, H. 等, EMBO J., 5, 2539-2544 (1986))。EcoRI を用いた消化によりこのクローンから放出される DNA フラグメントは Ny, T. 等, Proc. Natl.

1. Acad. Sci. USA, 83:6776-6780 (1986) に報告されているPAI-1配列ヌクレオチド147-2013に対応した。このフラグメントをプラスミドベクターpUC18 (Yanisch-Roussell, C. 等, Gene, 33:103-119 (1985)) にサブクローニングし、組み替えプラスミドpPAI-1を得た。このプラスミドからの挿入を、バクテリオファージラムダgt11に構築したヒトの内皮細胞cDNAライブラリのスクリーニングに使用した (Huynh, T. 等, DNA Cloning, 1巻, 出版: Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁49-88 (1985))。このようにして単離したcDNAクローンのひとつ、すなわちラムダPAI-1-11Aは、5'末端に2箇の余分なヌクレオチドが存在する以外既報の (Pannekoek, H. 等, EMBO J., 5:2539-2544 (1986)) PAI-1 cDNAと同一配列の挿入を持つ。このクローンの5'末端、ヌクレオチド52-1479から誘導したEcoRI-BglIIフラグメントをpPAI-1の3' BglII-EcoRIフラグメントに融合させ、pPAI-1-RBRを得た。

【0107】哺乳類細胞におけるPAI-1の発現に使用したSV40ベクターは以下の要領で構築した。pPAI-1-RBRから放出されたEcoRIフラグメントの末端にEcoRI DNAポリメラーゼのクレノウフラグメントを滴下し、合成XbaIリンカーに連結し、プラスミドpSVcat-PA3中のcat-PA3フラグメントの代わりに挿入し、pSV_L-PAI-1を得た (Sambrook, J. 等, Mol. Biol. Med., 3:459-481 (1986))。SV_L-PAI-1の株を製造し、Doyle, C. 等, J. Cell Biol., 105:704-714 (1985) に記載の要領で増殖させた。

【0108】以前にPannekoek, H. 等, EMBO J., 5:2539-2544 (1986) 及びGinsberg, D. 等, J. Clin. Invest., 78:1673-1680 (1986) に記載されたPAI-1クローンはpPAI-1-RBRによりコードされる配列と同一配列のPAI-1タンパク質をコードし、SV_L-PAI-1の構築にpPAI-1-RBRの代わりに使用することができた。

【0109】CV-1シミアン細胞の単層を37°Cで成長させ、SV_L-PAI-1を注入した。24時間後、培地を血清を含まないダルベッコの培地 (GIBCO, Inc.) に置換し、さらに48時間インキュベーションを続けた。その後分泌されたPAI-1を含む上澄み培地を0.45ミクロンのフィルター (Nalgene Co.)

を通して濾過した。Nonidet P40 (Sigma Chemical Co.)、及び1.0Mのリン酸ナトリウム (pH 7.2) 緩衝液をそれぞれ0.1% (v/v) 及び10mMの濃度まで加えた。安定化した培地を、20mMのリン酸ナトリウム (pH 7.2)、135mMのNaCl、7.0mMのKClから成る緩衝液 (後文では"PBS") を用いて1時間当たり50mlの流量で平衡化したコンカナバリアンA-セアロックス-4Bのアフィニティーカラム (充填容量1.0ml) に適用した。カラムを0.1% (v/v) のNonidet P40を含むPBS、2.5容量、0.1% (v/v) のNonidet P40、及び1.0MのNaClを含むPBS 2.5容量、及び最後に20mMのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 1.0容量で連続的に洗浄した。結合PAI-1は20mMのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) 中の0.5Mのアリファーマイル-D-グルコシド (Sigma Chemical Co.) で特異的に溶離した。PAI-1を含む留分 (上記間接的色素分析法においてCalbiochem, Inc. からのウロキナーゼの阻害により分析して) をアールした。その後Nonidet P40を0.1% (v/v) の濃度まで加え、アールした溶離物1ml当たり0.57gのシアニジンヒドロクロリド (U. S. Biochemicals) を加えた。このようにして得た部分的精製PAI-1を20mMのリン酸ナトリウムから成る緩衝液 (pH 7.2)、及び10% (v/v) のグリセロールに対して透析し、使用まで-80°Cにてアールコートとして保存した。

【0110】このようにして製造したPAI-1は40 µg/mlの全タンパク質 (Bio-rad Inc. 販売によるBio-radの試験により分析)、及び12.5% (w/v) のSDS-ポリアクリルアミドゲルの染色により分析して15 µg/mlのPAI-1を含んでいた。ウロキナーゼ (それ自身は³H-ジイソプロピルアルホロホスフェート (New England Nuclear, Inc. からのNET-065) を用いた滴定により活性52%) に対する滴定により、本文の記載に従って製造したPAI-1の活性は16-6%であり、活性PAI-1の濃度は48nMであることが明らかになった。

【0111】B「突然変異誘発のためのPAI-1部位の選択」

PAI-1の残基Glu₄₅₀及びGlu₄₅₁がt-PAと相互作用するという仮定を試験するため、特定トリゴヌクレオチドの突然変異誘発を使用して下表X11に示すPAI-1の2種類の変異株を形成した。

【0112】

表X11

346・

・355

野生型 PAI-1

RMAPEEIMD

PAI-1 (E₃₅₀→R)

FMAPREIMD

PAI-1 (E₃₅₁→R)

FMAPREIMD

変異株 PAI-1 (E₃₅₀→R)、及び PAI-1

(E₃₅₁→R) はそれぞれ Glu₃₅₀ 及び Arg₃₅₁ の Arg への置換を含み、負に帯電した Glu 残基を正に帯電した Arg 残基に代え、t-PA (R₃₀₄→E) に存在する負に帯電した Glu 残基との有力な相互作用を促進するために選択的に選んだ。置換が t-PA の残基 Arg₃₀₄ に導入された特異的変異と相補的であれば、Glu₃₅₀ を t-PA (R₃₀₄→E) 変異株などとの相互作用が強化された PAI-1 を形成する他のいろいろな置換基に、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく置換することができた。

【0113】C. PAI-1 のオメガ1-1オチド-媒介突然変異誘発

第1に、オチド-PAI-1 を直接発現し、一方で発現ベクターからのオチド配列及び cDNA の5'非翻訳領域を除去するための、プラスミド pPAIST7 と称する PAI-1 発現プラスミドの構築が必要であった。この達成のため、合成 DNA リンカーを使用して PAI-1 コード配列の両末端の再構築、及び成熟 PAI-1 の第1残基をコードするトリプレットの直前に ATG タンパク質合成開始コドンの導入を行った。さらにプラスミド pBR322 の cDNA コード領域の挿入を容易にするため、PAI-1 cDNA フラグメントのそれぞれ5'及び3'末端に、EcoRI 及び HindIII 制限エンドヌクレアーゼ認識部位を形成するリンカーを設計した。

【0114】特に ApaI 及び PstI MI を用いて pPAI-1-RBR を消化することによりプラスミド pPAIST7 を得た。得られた PAI-1 の残基1のための26bpのコドン、及び379残基タンパク質の残基2-376のための全コード配列を含む1127bp フラグメントをゲル電気泳動により精製した。次に合成リンカー（5'末端にて10bp、及び3'末端にて13bp）を1127bp ApaI、及び PstI MI-DNA フラグメントと連結し、EcoRI 及び HindIII を用いて消化し、1146bp EcoRI-及び HindIII-消化 DNA フラグメントをゲル電気泳動により単離した。その後このフラグメントを EcoRI-及び HindIII-消化 pBR322 にクローニングした。

【0115】発現プラスミドの構築の開始のために、サブクローンを EcoRI で消化し、直鎖プラスミドを細菌のアルカリホスファターゼを用いて脱ホスホリル化した。その後 trp プロモーター、及びリボソーム結合部位を含む pC5A-48 からの360bp EcoRI

DNA フラグメント (Franke, A. 等, *Meth. Enzymol.*, 162: 653-668 (1988)) を用いて、二フラグメントを連結することにより PAI-1 発現プラスミドを構築した。次に、得られたプラスミドを用い、Maniatis, I. 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第1版, Cold Spring Harbor (1982) に記載の要領で *E. coli* の形質転換を行った。得られた形質転換物のプラスミド DNA を HindIII を用いた制限分析により trp プロモーター-フラグメントの存在、及び配向に関してスクリーニングを行った。多くの形質転換物が trp プロモーターに隣接して阻害剤の直接の発現に必要な立体配置で PAI-1 遺伝子を持つプラスミドを含むと同等された。それらのプラスミドのいくつかを pPAIST7 と称した。

【0116】アミノ酸残基 Val₂₈₄ から Pro₃₇₉ までをコードする PAI-1 のオチド配列を含むプラスミド pPAIST7 の SalI-HindIII フラグメントを SalI-HindIII 消化複製型 M13 mp18 (図9を参照) に連結した。連結 DNA を *E. coli* 株 TG-1 にトランスフェクトした。組み替えが成功したコロニーにより生成された白色コロニーを採取し、適した290塩基対 SalI-HindIII フラグメントの存在をサブクローニング、制限マッピング、及び DNA 配列決定により確認した。

【0117】290塩基対 SalI-HindIII フラグメントにおける変異を t-PA についての上記の記載の要領で t-ホスホリル化合成突然変異誘発オリゴヌクレオチドプライマーを用いて導入した (図9を参照)。これらの PAI-1 変異株の構築に使用した3個の突然変異誘発プライマーの配列は以下である：

PAI-1 (E₃₅₀→R): 5' TGATGATCTCTCTGGGG 3'

PAI-1 (E₃₅₁→R): 5' CCA7GATGATCTCTCTGGGG 3'

得られた PAI-1 cDNA の変異株 SalI-HindIII フラグメントの配列を完全に決定した。立証された変異株の DNA の二重鎖複製型を単離し、変異290塩基対 SalI-HindIII フラグメントを SalI-HindIII 消化、及び6.0% (w/v) の非変性ポリアクリルアミドゲルを通した電気泳動により単離した。下記に詳細に記載する通り、変異を含むこれらのフラグメントを使用し、問題の PAI-1 変異株をコードする PAI-1 cDNA のバージョンを再構築した。

【0118】D. 変異株 PAI-1 のための発現ベクター

ーの構築

プラスミド pPAIST7HS (ヌクレオチド対1におけるHindIII部位、及びヌクレオチド対2106におけるSalI部位の欠落したプラスミドpPAIST7の誘導体であり、PAI-1 cDNAコード配列における変異SalIのHindIIIフラグメントへの交換を容易にするために構築された)におけるPAI-1の変異株を以下の要領で構築した。

PAI-1 cDNAの中心290塩基対のSalIからHindIIIまでのフラグメントを、SalI及びHindIIIを用いた消化、及び1.0% (w/v) アガロースゲル電気泳動によりプラスミドpPAIST7HSから除去した。その後、ホスト-DNAを残留直鎖フラグメントを特定オリゴヌクレオチドの突然変異誘発で製造した上記の290塩基対SalIからHindIIIフラグメントの変異株のcDNAに連結した (図9を参照)。得られたプラスミドをpPAIST7HS (E₃₅₀-R) 及びpPAIST7HS (E₃₅₁-R) と称した。

【0119】E. coli 株DH-1 (Hanahan, D. 等, DNA Cloning, 1巻, 出版: Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁109-135 (1985)) を上記変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpPAIST7HS [DH-1], pPAIST7HS (E₃₅₀-R) [DH-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁-R) [DH-1] と称した。E. coli 株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984)) を上記変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpPAIST7HS [TG-1], pPAIST7HS (E₃₅₀-R) [TG-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁-R) [TG-1] と称した。正しいフラグメントの存在に適した放射標識突然変異誘発オリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成、及び核酸配列決定により確認した。

pPAIST7HS (E₃₅₀-R) [DH-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁-R) [DH-1] をAmerican Type Culture CollectionにてそれぞれATCC番号68155及び68156として供託した。

【0120】E. coli 野生型、及び変異株PAI-1の発現、抽出、及びアッセイ

E. coli 株pPAIST7HS [TG-1], pPAIST7HS (E₃₅₀-R) [TG-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁-R) [TG-1] を、レリアーブルタンニブイオン中で37℃にて飽和濃度まで終夜育成した。50 μ lの培養物を使用して、1リットル当たり6.0gのNa₂HPO₄, 3.0gのKH₂PO₄, 0.5gのNaCl, 0.5gのNa₂SO₄・7H

2O, 1.0gのNH₄Cl, 5.0gのカサミノ酸, 10.0gのグルコース, 10.0mlのグリセロール, 1.0mgのチアミン-HCl, 及び2.5mgのアスピリンを含む修正M9培地 (pH7.4) 50mlに接種した。250mlのアーレンマヤークラフ液中、37℃にて培養細胞を22時間育成した。抽出細胞を以下の要領で培養物から得た。

【0121】E. coli を遠心によりペレット化し、20mlの冷50mMトリプ-HCl (pH8.0)、及び1.0mMのEDTA中で遠心により洗浄し、ホ上の3.6mlの同緩衝液中に再懸濁した。1ml当たり10mgのリゾチム0.4mlを添加して20分間、0.1mlの10% (v/v) Nonidet P-40を添加して10分間、及び0.2mlの5.0M NaClを添加して10分間抽出を行った。超音器 (sonifier) 細胞切断器のミクロチップを50%使用サイズに、及び設定7 (Branson Sonic Power Company) で使用して細胞を短く切断し、粘度を下げ、4℃にて30分間15,000xgの遠心を行った。透明な溶菌体に10% (v/v) までグリセロールを加え、PAI-1を含む抽出物を使用まで-80℃にてアリコートとして保存した。

【0122】哺乳類細胞に発現したPAI-1に関して上記に記載した要領でウロキナーゼを用いて24℃にて3時間インキュベートすることにより、抽出物を活性PAI-1に関して滴定した。野生型PAI-1, PAI-1 (E₃₅₀-R), 及びPAI-1 (E₃₅₁-R) の抽出物はそれぞれ803nM, 593nM, 及び162nMの活性PAI-1を含んでいた。

【0123】野生型、及び変異株t-PAと野生型、及び変異株PAI-1の相互作用の速度に関する速度論的測定を、0.1mMのEDTA及び0.1% (v/v) のソニー20を含む0.1Mトリプ-HCl緩衝液 (pH7.4) 中、24℃にて行った。上記のt-PAに関する間接的色素測定法を用いて残留酵素活性を時間の関数として決定した。t-PAに対して過剰のPAI-1の偽-1次条件下で、時間に対する残留t-PA活性の直線状対数プロットの傾きから各阻害剤濃度に関して半減期 (t_{1/2}) を決定した。見掛けの速度定数 (k_{app} = 0.693 / t_{1/2}) を阻害剤濃度で割って速度定数 k_i を算出した。

【0124】60pMのt-PAの阻害の速度を、偽-1次条件下で0.6-100nMの範囲の阻害剤濃度にて研究した。t-PA-PAI-1混合物をマイクロタイタープレートウェル中、24℃にて種々の時間 (0-30分) 予備的にインキュベートし、その後Lys-ブラスミンゼン、スベクトロザイム PL, 及びDes-A-フィブリノーゼンをそれぞれ最終濃度300nM, 0.4nM及び12.5 μ g/mlまで添加した。基質の添加後、マイクロタイタープレートを37℃にて

インキュベートし、405 nmにおける吸収を2次間追跡して残留t-PA活性を決定した。

【0125】野生型、及び変異株PAI-1による野生

型、及び変異株t-PAの阻害の最高速度定数 ($M^{-1}s^{-1}$) を下表X111に示す。

【0126】

表X111

	野生型 t-PA	t-PA (R ₃₀₄ →S)	t-PA (R ₃₀₄ →E)
野生型PAI-1	1×10^6	3×10^5	1×10^4
PAI-1 (E ₃₅₀ →R)	1×10^6	1×10^6	1×10^6
PAI-1 (E ₃₅₁ →R)	3×10^5	1×10^5	1×10^5

上記の表X111に示す通り、PAI-1 (E₃₅₀→R) 及びPAI-1 (E₃₅₁→R) の両方とも、野生型PAI-1と比較して、t-PA (R₃₀₄→E) との相互作用の速度定数が増加しており、変異によりセリン-プロテアーゼインヒビター抵抗性t-PA (R₃₀₄→E) の阻害に関するPAI-1の能力が復活したことを証明している。本発明を特別な具体化を参照して詳細に説明したが、種々の変化及び修正が本発明の精神、及び範囲から逸脱することなく可能であることが同業者には明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】キモトリプシン-スーパーファミリーの種々のセリン-プロテアーゼの配列の比較を示す。配列は、保持されたアミノ酸の重複がわかるように並べた。トリプシン上の数字はプロテイン-データ-バンクのPDB 3ptp.ent エントリで使用されている番号付による。t-PA上の数字は成熟t-PA分子におけるアミノ酸による。

【図2】セリン-プロテアーゼインヒビターのセルビン-ファミリーの種々のメンバーの配列の比較を示す。配列は保持されたアミノ酸の重複がわかるように並べた。アルファ-1-アンチトリプシン下の数字、及びPAI-1上の数字は成熟分子におけるアミノ酸残基による。

【図3】セリン-プロテアーゼインヒビターのセルビン-ファミリーの種々のメンバーの配列の比較を示す。配列は保持されたアミノ酸の重複がわかるように並べた。アルファ-1-アンチトリプシン下の数字、及びPAI-1上の数字は成熟分子におけるアミノ酸残基による。

【図4】野生型t-PA、及び本発明のt-PAのセルビン抵抗性変異株の変異、及び発現に用いられたベク

ターの構築を図示したものである。

【図5】野生型t-PA及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性の間接的色素澱粉法における比較を示す。図5で■は野生型t-PAを示し、□はt-PA (R₃₀₄→S)を示し、□はt-PA (R₃₀₄→E)を示し、・はt-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)を示す。

【図6】間接的色素澱粉法による野生型t-PA、及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性に対するPAI-1の効果を示す。図6において、■は野生型t-PAを示し、□はt-PA (R₃₀₄→S)を示し、□はt-PA (R₃₀₄→E)を示し、・はt-PA (De1₂₉₆₋₃₀₂)を示す。

【図7】間接的色素澱粉法による野生型t-PA、及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性の比較を示す。図7において、□はt-PA (H₂₉₇→Y)を示し、・は野生型t-PAを示し、+はt-PA (K₂₉₆→E)を示し、■は三重変異株t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E)を示し、▲はt-PA (R₂₉₉→E)を示し、△はt-PA (R₂₉₈→E)を示し、○はt-PA (P₃₀₁→G)を示す。

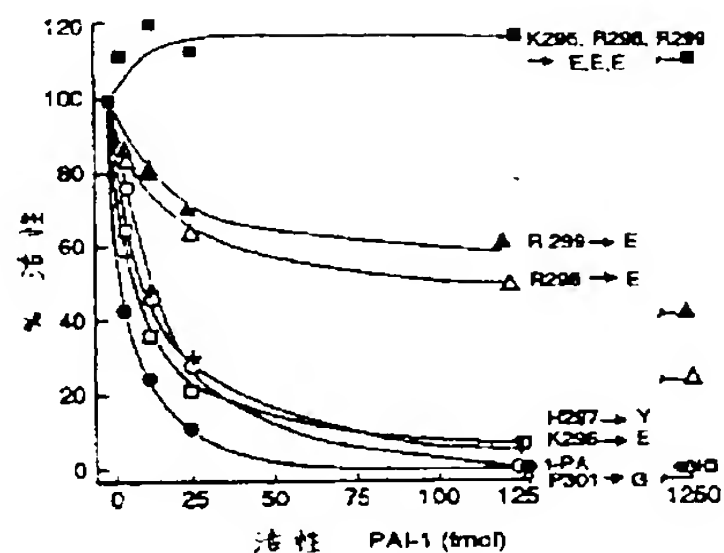
【図8】間接的色素澱粉法による野生型t-PA、及びt-PAのセルビン抵抗性変異株の活性に対するPAI-1の効果を示す。図8において、□はt-PA (H₂₉₇→Y)を示し、・は野生型t-PAを示し、+はt-PA (K₂₉₆→E)を示し、■はt-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E)を示し、▲はt-PA (R₂₉₉→E)を示し、△はt-PA (R₂₉₈→E)を示し、○はt-PA (P₃₀₁→G)を示す。

【図9】野生型PAI-1、及び本発明のPAI-1の変異株の変異、及び発現に使用したベクターの構築を図示したものである。

【表1】

	16	39	50
トリプシン	IVGGYTCCGAN	TVPYQVSLNSGYH FCGGSLINSQ
		296	302
TPA LT. 金鎖	IKGGLFADIA	SHPWQAAIFA	KHRRSPGERF LCGGILISSC
ウロキナーゼ	IGGEFTTIEN	Q.PWFAAIYR	RHRGGS.VTY VCGGSLMSFC
プラスミン	VVGCCVAPPH	SWPWQVSLRTRFGMH FCGGTLISPE
プロテイン C	DQEDQVDPRL	IDGKMTTRGD	S.PWQVLLDSKQGL ACQAVLIHPS
トロンビン	IVEGQDAEVG	LSPWQVMLFRKSPQEL LCGASLISDR
	57		
トリプシン	WVVSAABCYK	S.....GIOV	RLGEDNINVV EG.NEQFISA SKSIVH....
	322		350
TPA LT. 金鎖	WILSAABCFO	ERFPPHHLTV	ILGR.TYRVV PGEEOQKEV EKYIVHK...
ウロキナーゼ	WVISATHECFI	DYPKKEDYIV	YLGR.SRLNS NTQGENKFEV ENLILHK...
プラスミン	WVLTAABCLE	KSPRPSSYKV	ILGA.HQEVN LEPRVQETEV SRLFL.....
プロテイン C	WVLTAABCHD	ESKCL.....V	RLGEYDLRRW EKWEL.DLDI KEVTVH....
トロンビン	WVLTAABCLL	YPPWDK....N	FTVDDLLVRI GKHSRTYER KVEKISMCDK
	102		
トリプシンPSYNS	NTLNNDIMLI	KLKSA..... ASLNSRVASI SLPTSCASAG
		371	400
TPA LT. 金鎖EFDD	DTYDNDIALL	QLKSDSSRCA QESSV.VRTV CLPFADLQLP
ウロキナーゼDYSADT	LAHNDIALL	KIRSKEGRCA QPSRT.IOTI CLPSMYNDPC
プラスミンEPTKDIALL	KLSSP.....	AVITDKVIPA CLPSPNYVVA
プロテイン CPNYSK	STTDNDIALL	HLAQP..... ATLSQITVFI CLPDSGLAEP
トロンビン	IYIHPRYNWK	ENLDRDIALL	KLKRP..... IELSDYIBPV CLPDKQTAAY
		150	
トリプシンTQCL	ISGWGNTKSS	GT.SYDVLK CLKAPILSDS SCKSAYPGQ.
TPA LT. 金鎖	DW.....TECE	LSGYGKHEAL	SP.FYSERLK EAHVRLYPSS RCTSQHLLNR
ウロキナーゼ	FG.....TSCE	ITGFGKENST	DY.LYFEQLK MTVVKLISHR ECOQPHYYS
プラスミン	DR.....TECF	ITGWGETOGT	...FGAGLLR EAQLPVIENK VCNRYEFLNG
プロテイン C	ELNQAGQETL	VTGWGYHSSR	E.KKAKRRT FVLNFIKIPV VPMNECSEVM
トロンビン	LLH.AGFKGR	VTGWGNRRET	WTSVAEVOP SVLQVWNLPL VERPVCKAST
		195	200
トリプシン	...ITSNMFC	AGYL.EGG..	...KDSQCGD SGGFVVCS... ..GKLCGI
	450		478
TPA LT. 金鎖	T..VTDNMLC	AGDTRSGGPO	ANLEDACQGD SGGFLVCLND ..GRMTLVGI
ウロキナーゼ	E..VTRMLC	AAD.....PQ	.WXTDSCQGD SGGFLVCSLQ ..GRMTLTGI
プラスミン	R..VQSTELC	AGHL.....	..ATDSCQGD SGGFLVCFEK ..DKYILOST
プロテイン C	SNMVSENMFC	AGIL.....	GDRQDACEGD SGGPMVASFB ..GTWFLVGL
トロンビン	RIRITONMFC	AGYK...PGE	GKRGDACEGD SGGPFVMKSP YNNRWYQMSI
	214		245
トリプシン	VSWGSGCAQK	NKPGVYTKVC	HYVSWIKQTI ASN.....
	500		527
TPA LT. 金鎖	ISWGLGCGOK	DVPGVYTKVT	NYLDWIRDNM RP.....
ウロキナーゼ	VSWGRCALK	DKPGVYTRVS	BFLPWIRSHI KEENGLAL..
プラスミン	TSWGLGCRP	NKPGVYVRVS	RFVTWIEGVM RNN.....
プロテイン C	VSWGEGCGLL	BNYGVYTKVS	RYLDWIHGHI RDKEAPQSW AP
トロンビン	VSWGEGCDRD	GKYGFYTFV	RLKKWIQKVI DRLGS.....

【図8】



[圖2]

PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoIIGSKGFLD	OLENGGETAQ	SADPQWEQLN	NKNLSMFLLP
Clinhibitor	NFNATSSSSQ	DPESLQDRGE	GKVATTVISK	MLPVEPILEV	SSLPTTNSTT
PAI-1	1 ...VNEFFSY
AntitrypsinEDPOGD 1
PAI-2
A-chymotrypNSPLD
A2-antiplasNQE	QVSFLTLRL	GNQEPGGQTA
A-thrombIIICHGSPV	DICTAKPROI	PMNPMCIYS	PEKKATEDEG
HeparinCoII	ADPKENTVT	NOMIPEGED	DDYLDLEKIF	SKDDDYIDIV	DSELEVEPTDS
Clinhibitor	NSATKITANT	TDEPTTQPTT	EPTTQPTIQF	TQPTTQLFTD	SPTQPTTGSF
PAI-1	VAHLA.....SDFGVR	VYQOVAQ.AS	KDRNVVFSFY
Antitrypsin	AAQRTDTSEH	DQDEPTFNKI	TPMLAEFAPS	LYRQLAM.QS	NSINIFFSPV 50
PAI-2MEDLCVA	NTLFALNLFK	HLAK.ASPTO	NLFLESFWSIS
A-chymotryp	EENLTQENQD	RGTEVDGLA	SAMV.DFAPS	LYKQLVL.KA	LDMNVIFSPL
A2-antiplas	LKSPFGVCSR	DPTPEQTHRL	ARAHMAFTAD	LPFLVAO.TS	TCFNLILSPL
A-thrombIII	...SEOKIP	KATNRVWEL	SEANSRPATT	FYQHLADSEN	DNDNIFLSPL
HeparinCoII	DVSAGNLOL	FKGSRIOBL	NILNAKFAFW	LYRVLEDOVM	TFDNIFIAPV
Clinhibitor	CPGFVTLCSO	LESSESTAVL	GDALVDVSLK	LYHAFSAMKK	VETNMAFEPF
PAI-1	50
Antitrypsin	GVASVLAMLO	LTTGGETOQQ	IQAANGFKID	D.....
PAI-2
A-chymotryp	STRANVTNGS	RGSTEDQMAK	VLOFNEVGAN	AVTFRTFENY	TSCGFHQOIQ
A2-antiplas	SISTALAFLS	LGAENTTLTE	ILKASSSPHQ	D.....
A-thrombIII	SVALALSELA	LGAQNTLOR	LOQVLEAGSG	F.....
HeparinCoII	SISTAFANTK	LGAQNTLQQ	LNEVPEFDTI	SEKTSQIHF
Clinhibitor	GISTANGNIS	LGLRGETHQ	VHSILEPKDF	VN.....
PAI-1
Antitrypsin	SIASLLTQVL	LGACQNTKTN	LESILSTPKD	PTCVRQALKG	F.....
PAI-1	100
AntitrypsinRGM	APALRELYRE	LNGPWNDE.	ISTTDAIFVQ
PAI-2
A-chymotryp	RGSTYDAILQ	AQAADKISS	FRSLSSAINA	STGDYL.LES	VNKLFGERSA
A2-antiplasLLRQKF	TQSPQELRAP	SISSEDELO.	LSNGMANFVK
A-thrombIIICLPMLLR	LCODLGFGA.	FLAARHYLO
HeparinCoIIFFAKLNCR	LYRKANESSK	LVSANLYGD
Clinhibitor	ASKEYEITTI	ENLPKELTER	LFRNPGYT.	LRSVMDLYIQ
PAI-1
Antitrypsin	RDLELVQGFN	PEFFRLFRST	VKQVDFSE.V	ERARFIINDW	VKTWTEGHIS
PAI-2
A-chymotryp	EGLKLVDEFI	EDVKKLYESS	ACTVN7OD.T	SEAEKQINDY	VEROTQGFIV
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhibitor
PAI-1
Antitrypsin
PAI-2
A-chymotryp
A2-antiplas
A-thrombIII
HeparinCoII
Clinhibitor

```

150
PAI-1      NLLGAGAVDQ LTLVLVNL YFNGQWKTFF PDSSTHRLY HRSDGSTVSV
Antitrypsin DLV..KELDR DTVFALVNYI PFKGWERPF EVKDEEEDF HVDQVTVRV

200
PAI-2      PEGSVGGDTR MVLVNAVYFR GKWTFFFRK LNGLYFFRVN SAQRTFVCHM
A-chymotryp DLI..KDPDS QTHMVLVNYI PFKAKWEMPF DPQDTHQSRF YLSKRWVHV
A2-antiplas EFLS..GLPE DTVLLLLNAI HFQGFWRNKF DPSTLQDSEF ELDEQFTVPV
A-thrombIII DVIPSELINE LTVLVLVNTI YFKGLWKSFF SPENTREKLY YKADGESCSA
HeparinCoII DALS..NIDP ATOMHILNCI YFKGEMVNFY PVENTENHMF ALNEREVVVF
Clinhibitor RLLD..SLPS DTRLVLLNAI YLSAKWKTFF DPKRTMEFF HFRNSVIKVF

250
PAI-1      PMMAQTNKFN YTEPTTDFGH YYDILELPYH GDTLSMFIAA PYERE..VPL
Antitrypsin PMMERLGMFN IQHC.KKLSS W..VLLMXYL GNANAIFFLP DEGR.....L

250
PAI-2      YLREKLNIGY IEDLKAQ... ILLEPYAGDV SHYLLLPDEI ADVSTGLELL
A-chymotryp PMNSLEHLTI PYFRDEELSC ..TVVELRYT GNABALFILP DQDK.....M
A2-antiplas EMHOARTYFL RWFLLLEQPEI ..QVAFFFFR NMMSYVVLVP TH.....FEW
A-thrombIII SMHYQEGKFR YNR..VAEGT ..QVLELFFR GDDITHVLIL FR.....PER
HeparinCoII SMHQTGKNFL AANDQELDCD ...ILQLEYV GGISMILVVP HRM.....SGM
Clinhibitor MNNSKKYPVA HFIDQTLKAK .VGQLQL..S ENLSLVILVP ONLE...HRL

250
PAI-1      SALTNILSAQ LISHWKGHMT ..RLPRLVL PPSLETEVD LR.KPLENLG
Antitrypsin QLENELTHD IITKPLEND ..RHSASLHL PLSITGTVD LR.SVLGQLG

300
PAI-2      ESEITYDKLN KWTSEKMAE DEVEYIYQF ELENYELA. SILRSHGED
A-chymotryp ZEVEAMLLPE FLKRWDSLE F.REIGELYL PPSISADYN LN.DILLQLG
A2-antiplas NVSQVLNLS WDTLEPPLVW ..KPTVRL PRLYLRNOMD LV.ATLSQLG
A-thrombIII SLAKVEKELT PEVLQEWLDE LSEHMLVVM PAFRIEDGFS LX.EQLQDMG
HeparinCoII KTLAQLTFR VVERWQKSKT ..NRTREVLL PPKLEKNYN LV.ESLRLMG
Clinhibitor EDMEQALSFS VPRAIKELK KSKPQPTLLT LPRIKVTISQ DMLSIKELZ

300
PAI-1      HTDMFRQ... FQADPTLSO QEPLEVAQAL QVKIEVNES GTVASEST..
Antitrypsin ITKVFSN... .GADLSGVT EAPLRLSKAV KEAVLTIDER GTEAAGAR..

350
PAI-2      AFNE...GRA NPSGHSERND LFLSEVPNQA NYDVNEEGTE AAAGTGGV..
A-chymotryp IEKAPTS... .KADLSGITC AMNLAVSQVY EKVVSDVFE GTEASAT..
A2-antiplas LQELFQA... ..FDLGGISE Q.SLVVSGVQ HQTLEHLEFV GVEAAAT..
A-thrombIII LVDLFSPEFS KLPGIVAEGR D.DLYVSDAF KEAFLEVNEE GSEAAAST..
HeparinCoII IRLHFD... .KNGNMAGIS DQRIADLFE HOGTITVNES GTQATTVT..
Clinhibitor PFDPSYD... ..LNLGCLTE DFDLQVBARQ HQTVLELTET GVEAAAS..

350
PAI-1      AVIVSARMAP EE....IIND RFFLFVVRH PTGTVLFNGQ VNEP.....
Antitrypsin FLEAIPHEIP FE....VRFN RFFVFLMIEQ NTRSPLFNGR VVNPTQK...

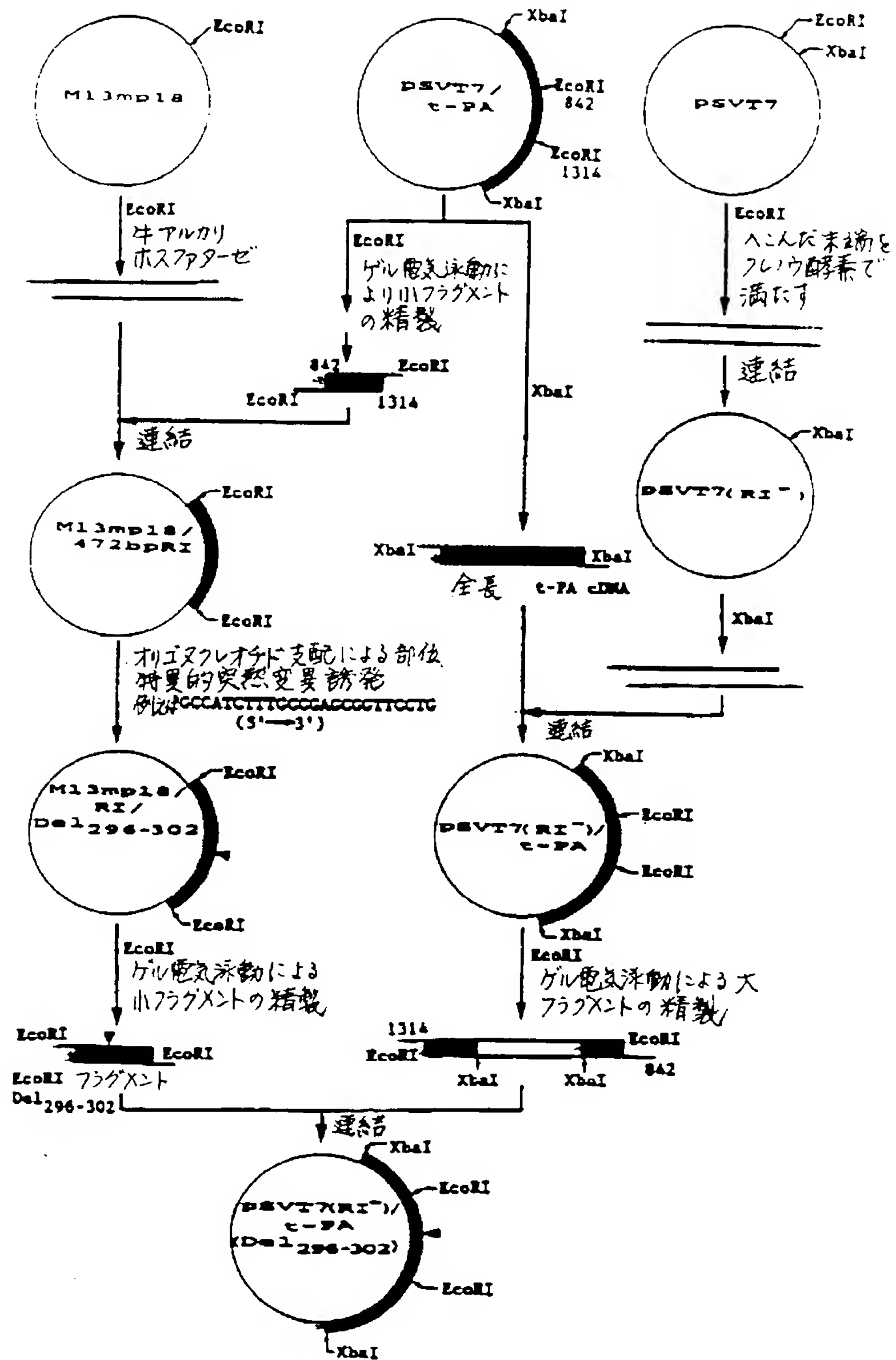
PAI-2      ...HTGRTGH GGPO..FVAD RFFLYLIMK ITRCILFFOR PCSF.....
A-chymotryp AVKITLLSAL VETRTIVRFH RFFLHIIVPT DTQNIFFHSE VTNP.SKPR
A2-antiplas .SIAMERHEL SS....FSVN RFFLFFIFED TTGLPLFVGS VRNPNFSAPR
A-thrombIII AVVIAGRELM PNEVT.FEAM RFFLVPIREV PLNTIIFNGR VANPCVK...
HeparinCoII TVGFRPLSTQ VR....FTVD RFFFLPIYEH RTSCLLFNGR VANPSRS...
Clinhibitor .AISVARTLL V.....FEVQ QFFLFVLWDQ QRRFPVFNGR VYDPRA...

PAI-1      .....
Antitrypsin .....

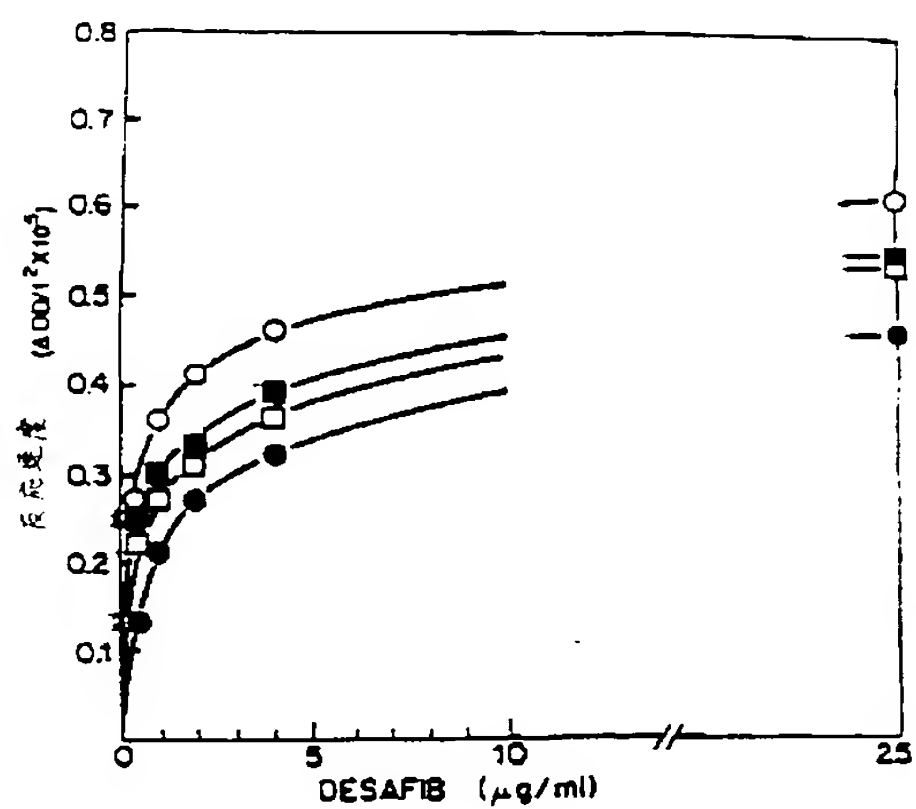
PAI-2      .....
A-chymotryp CIRQWGSQ.. .....
A2-antiplas ELKEQQQDSFG HEDFLQSLKG FPGQDKLFGP DLKLVPFHEE DYPQFGSPK
A-thrombIII .....
HeparinCoII .....
Clinhibitor .....

```

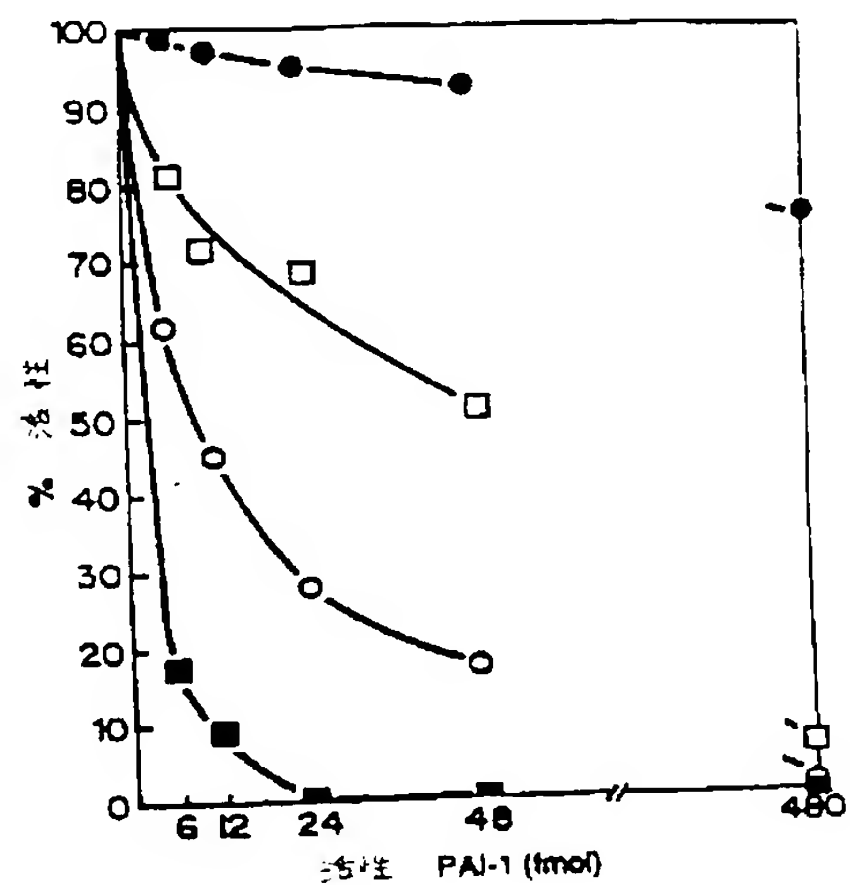

【図4】



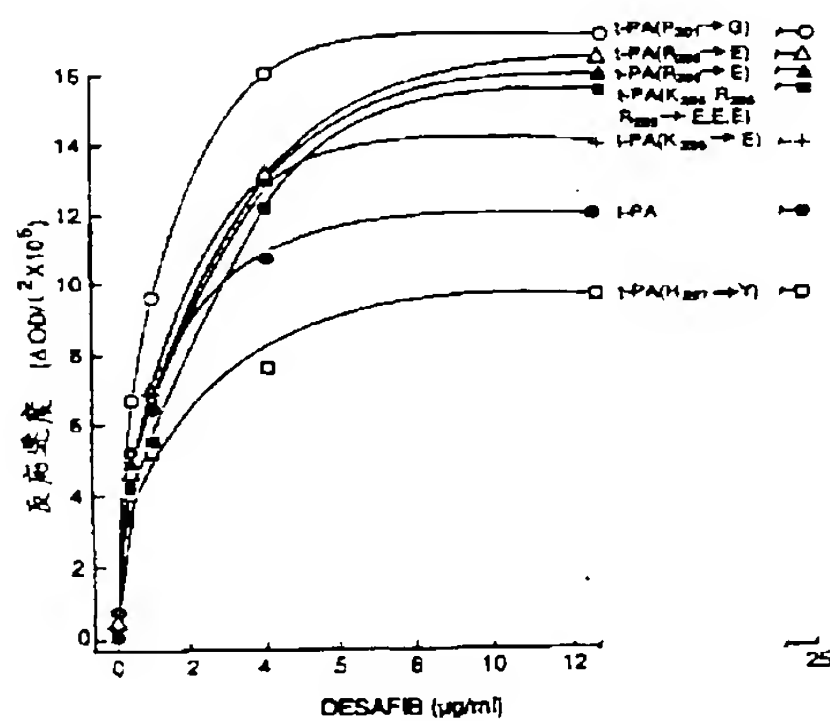
【图5】



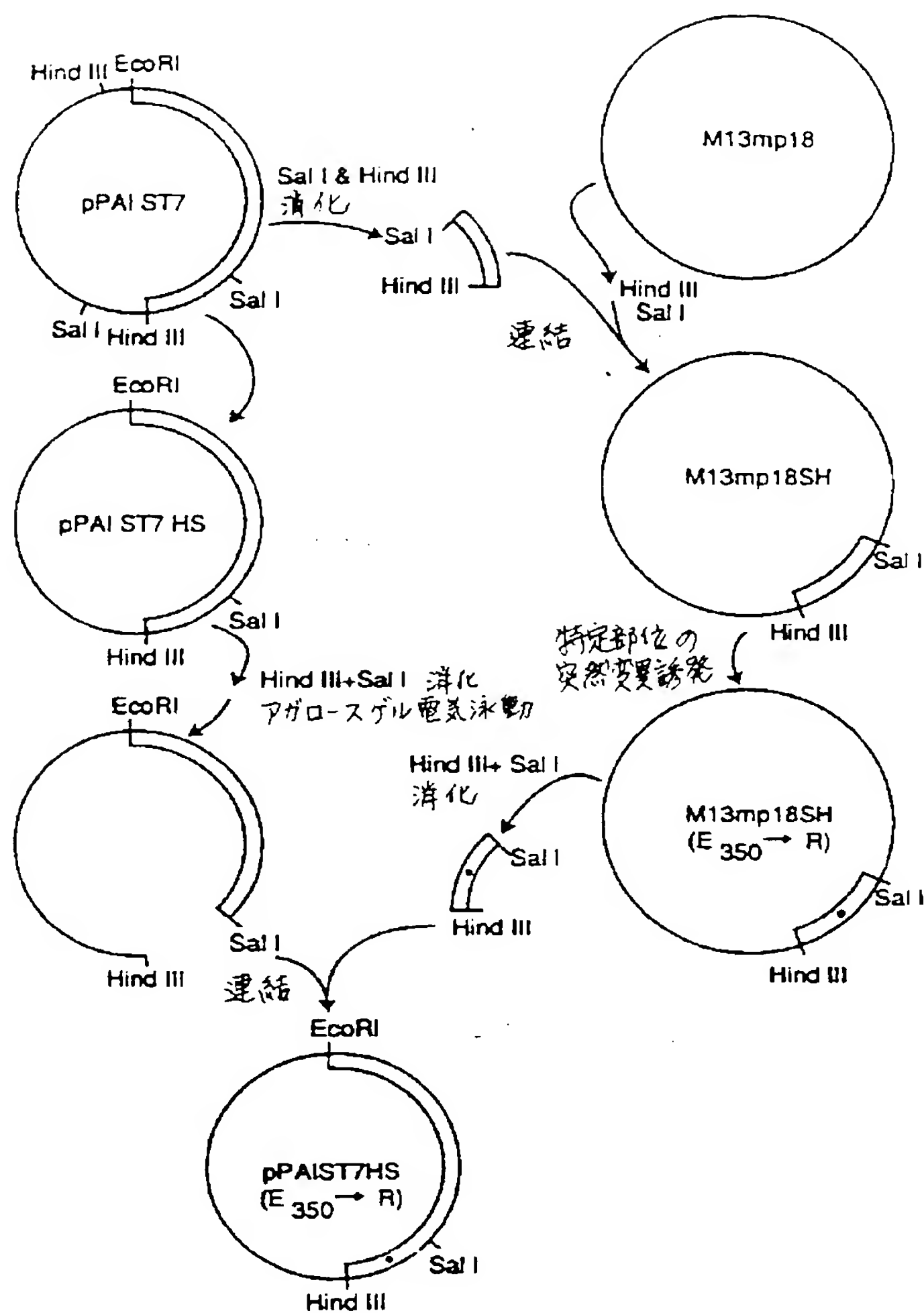
【图6】



【图7】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

(C 1 2 N 9'64

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

シーマコード (参考)

(72) 発明者 エドウィン・エル・マジソン
アメリカ合衆国テキサス州75209ダラス・
アパートメント202・ボルドードライブ
6203
(72) 発明者 エリザベス・ジェイ・ゴールドスミス
アメリカ合衆国テキサス州75209ダラス・
チエロキートレイル4626

(72) 発明者 マリイジェイン・エイチ・ゲシング
アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・
アービンシモンズドライブ4320
(72) 発明者 ロバート・デイ・ジェラード
アメリカ合衆国テキサス州75252ダラス・
フエザーウッドドライブ18620